

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung Medizinische Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Einfluss von PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating  
Polypeptide) beziehungsweise des PACAP-Rezeptors PAC1 auf  
die Morphologie der Nierenrinde bei cholesterin- und  
normalgefütterten ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Teresa Blähser aus Hachenburg

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

19. Juni 2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Koreferent: Herr Prof. Dr. Ivica Grgic

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Atherosklerose</b>	<b>2</b>
1.2	<b>Die Niere</b>	<b>5</b>
1.2.1	Anatomie und Funktion	5
1.2.2	Nephropathien und Atherosklerose	8
1.3	<b>PACAP</b>	<b>10</b>
1.3.1	Genetik und Struktur	10
1.3.2	Die PACAP-Rezeptoren	11
1.3.3	Funktionen und biologische Effekte	13
1.3.4	PACAP im Immunsystem	14
1.3.5	PACAP im kardiovaskulären System	14
1.3.6	PACAP in der Niere und den Harnwegen	15
1.4	<b>Apolipoprotein E</b>	<b>16</b>
1.4.1	Lipoproteine und deren Stoffwechsel	16
1.4.2	Die Apolipoproteine	19
1.5	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>26</b>
2.1	<b>Geräte und Material, Chemikalien, Antikörper, Software</b>	<b>26</b>
2.1.1	Geräte und Material	26
2.1.2	Chemikalien	26
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Software	28
2.2	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
2.2.1	Tiere und Versuchsaufbau	29
2.2.2	Gewinnung und Präparation des Gewebes und der Blutproben	30
2.2.3	Anfertigung von Kryoschnitten	31
2.2.4	Morphologie/Histologie	31
2.2.5	Immunhistochemie	32
2.2.6	Auswertung	35
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>40</b>
3.1	<b>Gewicht, Plasma-Cholesterin- und Plasma-Triglyceridspiegel</b>	<b>40</b>
3.1.1	Gewicht	40
3.1.2	Plasma-Cholesterinspiegel	41
3.1.3	Plasma-Triglyceridspiegel	42
3.2	<b>Morphologie des Nierenkortexes</b>	<b>44</b>
3.2.1	Anzahl der Nierenkörperchen	44
3.2.2	Fläche der Nierenkörperchen	45

3.2.3	Durchmesser der Nierenkörperchen .....	46
3.2.4	Relativer Anteil Bindegewebe im Nierenkortex .....	47
<b>3.3</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	MOMA-2 .....	48
3.3.2	F4/80.....	49
3.3.3	IL-6 .....	51
3.3.4	TNF $\alpha$ .....	55
3.3.5	Korrelation zwischen der Dichte IL-6- und TNF $\alpha$ -positiver Zellen .....	58
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Gewicht, Plasma-Cholesterin- und Plasma-Triglyceridspiegel .....</b>	<b>59</b>
4.1.1	Gewicht.....	59
4.1.2	Plasma-Cholesterinspiegel.....	60
4.1.3	Plasma-Triglyceridspiegel .....	62
<b>4.2</b>	<b>Morphologie .....</b>	<b>62</b>
4.2.1	Anzahl Nierenkörperchen .....	62
4.2.2	Fläche und Durchmesser der Nierenkörperchen.....	63
4.2.3	Relativer Anteil Bindegewebe im Nierenkortex .....	65
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>66</b>
4.3.1	Makrophagen: MOMA-2 und F4/80 .....	66
4.3.2	Zytokine: IL-6 und TNF $\alpha$ .....	68
<b>4.4</b>	<b>Kritik und Ausblick .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i> .....</b>	<b>73</b>
5.1	Zusammenfassung .....	73
5.2	Summary.....	75
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i>.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b><i>Verzeichnis akademischer Lehrer</i>.....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i>.....</b>	<b>107</b>

Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria, Arteriae (Plural)
AG	Arbeitsgruppe, -gruppen
AP	Alkalische Phosphatase
Apo	Apolipoprotein
Aqua dest.	Aqua destillata, deutsch: destilliertes Wasser
°C	Grad Celsius
CED	Cholesterol Enriched Diet
CKD	Chronic Kidney Disease, deutsch: Chronische Niereninsuffizienz
CVD	Cardiovascular Diseases, deutsch: Kardiovaskuläre Erkrankungen
DAB	Diaminobenzidin
DKO	Doppel-Knockout/Doppel-Knockouts (Deletion eines Gens)
engl.	Englisch
F4/80	F4/80 Antigen
F4/80 <sup>+</sup>	F4/80-positiv
g	Gramm
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GLP1	Glucagon-like Peptid 1
GLP2	Glucagon-like Peptid 2
GRF	Growth-Hormone Releasing Factor
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horseradish-Peroxidase-Complex
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL	Interleukin
IL-6 <sup>+</sup>	Interleukin-6-positiv
IU	International Unit, deutsch: Internationale Einheit
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
KO	Knockout/Knockouts (Deletion eines Gens)
l	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
M.	Musculus, deutsch: Muskel
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MOMA-2	Monozyten-Makrophagen-Antikörper-2
MOMA-2 <sup>+</sup>	MOMA-2-positiv
mRNA	messengerRNA/messenger Ribonukleinsäure
µm/µm <sup>2</sup>	Mikrometer, Quadratmikrometer
NF	Normalfutter
nm	Nanometer
ORO	Oil Red O
oxLDL	oxidiertes LDL
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein
PAC1	PACAP Rezeptor 1
PBS	Phosphate-Buffered Saline / phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PHM	Peptid Histidin-Methionin
PRP	PACAP-Related Protein

RT	Raumtemperatur
SD	Standard Diet, deutsch: Normalfutter
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TAG	Triacylglyceride, Synonym: Triglyceride
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
TNF $\alpha$ <sup>+</sup>	TNF $\alpha$ -positiv
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VPAC1	Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor 1
VPAC2	Vasoactive Intestinal Polypeptide Receptor 2
vs.	versus
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem
25x/100x/200x/400x	25fache/100fache/200fache/400fache Vergrößerung

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Lipoproteine, Einteilung nach ihrer Dichte, angelehnt an Rassow 2008 und Koolman und Röhm 2009 .....	17
Tabelle 2: Anzahl der Tiere nach Genotyp und Futtermittel .....	30
Tabelle 3: Immunhistochemie MOMA-2 und F4/80, Sekundärantikörper und Verdünnungen .....	33
Tabelle 4: Immunhistochemie TNF $\alpha$ , Sekundärantikörper und Verdünnungen .....	34
Tabelle 5: Immunhistochemie IL-6, Sekundärantikörper und Verdünnungen .....	35

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Gefäßwandveränderung, aus Rassow 2008 (modifiziert) .....	4
Abbildung 2: Die Makroskopie der Atherosklerose, aus Müller und Kuhlencordt 2017 .....	4
Abbildung 3: Nierenkörperchen, aus Lüllmann-Rauch 2009 (modifiziert) .....	6
Abbildung 4: Nierenkörperchen mit angeschnittenem Gefäß- und Harnpol, Azanfärbung .....	6
Abbildung 5: Nephron und dessen Topographie, aus Lüllmann-Rauch 2009 (modifiziert) .....	7
Abbildung 6: Glucagon-Protein-Superfamilie; aus Sherwood et. al. 2000 (modifiziert) .....	10
Abbildung 7: Aminosäuresequenz von PACAP27, 38 und VIP; aus Vaudry et al. 2009 (modifiziert) .....	11
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bindung des Liganden VIP an den VPAC1-Rezeptor; aus (Harmar et al. 2012), modifiziert nach Laburthe et al. 2007 (modifiziert) .....	12
Abbildung 9: Der Lipoproteinstoffwechsel im Überblick, aus Koolman and Röhm 2009 (modifiziert) .....	19
Abbildung 10: Die Struktur von ApoE3 und ApoE4, aus Mahley 2017 (modifiziert) .....	22
Abbildung 11: Vermessung des Nierenkortexes, Azanfärbung .....	36
Abbildung 12: Methodik Bestimmung Bindegewebsanteil im Nierenkortex .....	37
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit IL-6-positiver Zellen .....	38

Abbildung 14: Tiergewichte (in g) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	41
Abbildung 15: Plasma-Cholesterinspiegel (in mg/dl) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	42
Abbildung 16: Plasma-Triglyceridspiegel (in mg/dl) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	42
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von Blutlipiden (mittels ORO Färbung) in Glomeruli unterschiedlicher Genotypen .....	43
Abbildung 18: Exemplarischer Nierenquerschnitt zur Darstellung der Quantifizierung der Nierenkörperchen .....	44
Abbildung 19: Dichte der Nierenkörperchen (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	45
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung der Vermessung eines Nierenkörperchens .....	45
Abbildung 21: Fläche eines Nierenkörperchens (in µm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	46
Abbildung 22: Durchmesser der Nierenkörperchen (in µm) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	47
Abbildung 23: Anteil an Bindegewebe im Nierenkortex (in %) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	47
Abbildung 24: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: MOMA-2-positive Zellen .....	48
Abbildung 25: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: MOMA-2-positive Zellen .....	48
Abbildung 26: Dichte MOMA-2-positiver Zellen (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	49
Abbildung 27: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: F4/80-positive Makrophagen .....	49
Abbildung 28: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: F4/80-positive Makrophagen .....	50
Abbildung 29: Dichte F4/80-positiver Makrophagen (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	50
Abbildung 30: Dichte IL-6-positiver Zellen (n/mm <sup>2</sup> ) der ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach deren Lokalisation im Nierenkortex .....	51
Abbildung 31: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit IL-6-positiven Zellen .....	52
Abbildung 32: Dichte IL-6-positiver Zellen in den Glomeruli (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	53

Abbildung 33: Dichte IL-6-positiver Zellen im Tubulussystem (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	54
Abbildung 34: Dichte TNFα-positiver Zellen (n/mm <sup>2</sup> ) der ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach deren Lokalisation im Nierenkortex .....	55
Abbildung 35: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit TNFα-positiven Zellen .....	56
Abbildung 36: Dichte TNFα-positiver Zellen im Tubulussystem (n/mm <sup>2</sup> ) der WT, ApoE <sup>-/-</sup> , PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> bzw. PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED .....	57
Abbildung 37: Korrelation der Zelldichte IL-6-positiver bzw. TNFα-positiver Zellen bei PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäusen und PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> Mäusen .....	58



### 1 *Einleitung*

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen in vielen westlichen Industrieländern die Todesstatistiken an. Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems waren in 2015, wie auch in den Jahren davor, mit 39% die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2017). Die chronisch ischämische Herzkrankheit stellt laut statistischem Bundesamt mit 21,3% die häufigste Todesursache unter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar, danach folgen Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz mit jeweils 13%. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose steht ein veränderter Lipidstoffwechsel mit erhöhten Plasma-Cholesterin- und Plasma-Triglyceridspiegeln, für welchen die zunehmend fetthaltige Ernährung der Industrieländer mitverantwortlich ist. Das Apolipoprotein E spielt eine wichtige Rolle beim Lipidtransport im Blut, da es die Aufnahme der cholesterin- und triglyceridreichen Lipoproteine in der Leber vermittelt. ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse gelten als klassisches, tierexperimentelles Modell zur Untersuchung von Atherosklerose und Nierenerkrankungen (Zhou 2015). Das aus einem gestörten Lipidstoffwechsel resultierende Übergewicht stellt einen entscheidenden Risikofaktor für diverse Erkrankungen wie zum Beispiel Bluthochdruck, Diabetes, Koronare Herzerkrankungen und Atherosklerose dar. Durch Ernährung verursachtes Übergewicht steht zudem beim Menschen und im Maus- und Rattenmodell im Zusammenhang mit renalen Erkrankungen und deren Schwere allgemein (Proteinurie, Inflammation und erhöhte Zytokin-Expression sowie präneoplastische Läsionen) und mit glomerulären Erkrankungen im Speziellen (Wang et al. 2009; Stemmer et al. 2012). Fettreiche Nahrung und oxidierte Fette spielen eine Rolle bei der Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen und daraus resultierenden Gefäßwandschäden und Ablagerungen. Daher ist die Niere mit ihren zahlreichen Blutgefäßen gut geeignet, um neben den Auswirkungen der Gen-Knockouts von ApoE, PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein) und PAC1 (PACAP Rezeptor 1) auch den Einflussfaktor der Ernährung auf ihr morphologisches und inflammatorisches Erscheinungsbild hin zu untersuchen. Das Neuropeptid PACAP weist einen protektiven Effekt in diversen Geweben und Pathologien auf, so auch bei renalen Erkrankungen (Reglodi et al. 2012a), und spielt zudem auch im kardiovaskulären System eine wichtige Rolle. Inwieweit PACAP- bzw.

PAC1-Defizienz Auswirkungen auf die Morphologie der Nieren von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen hat, wird erstmals untersucht.

### 1.1 Atherosklerose

Entzündungsprozesse und Lipidstoffwechsel spielen eine Rolle in der multifaktoriellen Genese der chronisch verlaufenden Gefäßerkrankung. Prädisponierende Faktoren sind unter anderem Hypertonie, Hyperlipidämie, Hyperfibrinogenämie, Diabetes mellitus, Nikotin, Toxine, Alter, psychischer Stress und eine familiäre Belastung (Pschyrembel und Dornblüth 2004).

Der arteriellen Endothelzelle kommt eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Atherosklerose zu (Müller und Kuhlencordt 2017). Die Funktionszustände des Endothels kann man als einen antiinflammatorischen Ruhezustand und als einen proinflammatorischen Aktivierungszustand bezeichnen (Müller und Kuhlencordt 2017). Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel so gut wie nicht permeabel und erlaubt keine Leukozytendiapedese (Müller und Kuhlencordt 2017). Bei Aktivierung durch Inflammation resultiert neben einer Permeabilitätssteigerung eine Rekrutierung und Diapedese von Makrophagen, die allerdings nicht ins Interstitium auswandern, sondern in der Gefäßwand verbleiben (Müller und Kuhlencordt 2017). Eine Aktivierung kann durch mechanische Mehrbelastung aufgrund von Wirbelbildungen der Blutströmung an Prädilektionsstellen wie vor und nach Gefäßabgängen oder -krümmungen, insbesondere bei Bluthochdruck, sowie durch schädigende oxidative Einflüsse auf das Endothel stattfinden (Navab et al. 2004; Rassow 2008).

Neben einem gestörten Blutfluss ist auch die Akkumulation von Lipiden an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen entwickeln Labormäuse keine Atherosklerose; allerdings löst die Deletion des ApoE Gens (ApoE Knockout (KO)) eine schwere Hypercholesterinämie und eine spontane Atherosklerose aus (Hansson 2005). Ebenso entwickeln Mäuse, die einen Mangel an Low Density Lipoprotein (LDL) Rezeptoren aufweisen, eine Atherosklerose, insbesondere dann, wenn sie zusätzlich mit fettreicher Nahrung gefüttert werden (Hansson 2005). Bei Hypercholesterinämie konnte in Tier- und Humanstudien eine fokale Aktivierung des Endothels gezeigt werden (Hansson 2005).

Aktivierte Endothelzellen exprimieren vermehrt verschiedene Typen von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, was zunächst zum Rollen der Blutzellen entlang der Gefäßwand und nachfolgend zu deren Adhäsion führt (Eriksson et al. 2001; Hansson 2005). So werden beispielsweise die Adhäsionsmoleküle Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) exprimiert. Letzteres ist entscheidend für die Transmigration der Monozyten und macht das Endothel durchlässiger. Monozyten werden durch Kontakt zu Chemokinen während des Rollens aktiviert (Müller und Kuhlencordt 2017), dringen in die Intima ein und differenzieren sich hier zu Makrophagen. Sie geben wie bei einer Entzündungsreaktion inflammatorische Zytokine, Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid ab, wodurch LDL-Partikel oxidiert werden (oxLDL) (Rassow 2008), die dann von Zellen über sog. „scavenger“ Rezeptoren aufgenommen werden.

CD36 ist ein Rezeptor auf Makrophagen für oxLDL. Er ist nicht nur für die Aufnahme von oxLDL verantwortlich, sondern beeinflusst auch das Zytoskelett und die Expression von Adhäsionsmolekülen bei Makrophagen, sodass diese in der Läsion verbleiben und nicht auswandern (Park et al. 2009; Müller und Kuhlencordt 2017). Nach Phagozytose von oxLDL entstehen aus Makrophagen dann sog. Schaumzellen (engl. foam cells). Ansammlungen solcher Schaumzellen innerhalb der Intima zeigen sich makroskopisch als sog. Fettstreifen (engl. fatty streaks) (Rassow 2008), welche das erste Stadium der Atherosklerose darstellen (Abbildung 1). Fatty streaks sind häufig klinisch asymptomatisch und vollständig reversibel (Müller und Kuhlencordt 2017). Durch die zunehmende Veränderung der Gefäßwand verstärkt sich die endotheliale Dysfunktion. Im weiteren Verlauf binden auch Thrombozyten an der Läsion und glatte Muskelzellen wandern aus der Media in die Intima ein. Sie werden durch die Aufnahme von oxLDL ebenfalls zu Schaumzellen (Rassow 2008). Die sich anhäufenden Zellen bilden zunehmend Kollagen, Elastin und Proteine der extrazellulären Matrix, wodurch fibröse Plaques entstehen (Abbildung 1). Die fortgeschrittene Läsion weist einen zellarmen Kern („lipid core“) aus Zelldebris, einer fett- und kollagenreichen Matrix und Cholesterinkristallen sowie Schaumzellen auf. Eine Deckplatte aus glatten Muskelzellen und Kollagen schirmt das Atherom zum Gefäßlumen hin ab (Abbildung 1, Abbildung 2). Durch die in der Intima zirkulär wachsenden atherosklerotischen Plaques/Läsionen verengt sich zunehmend das Gefäßlumen, wodurch eine Lumenstenose resultiert

(Müller und Kuhlencordt 2017). Solche Plaques, die nur in einem Teil der Zirkumferenz wachsen, wölben sich durch den Blutfluss und -druck nach außen vor (Müller und Kuhlencordt 2017). Die Gefäßveränderungen führen zu einer Versteifung der Wände, Bildung von Verkalkungen und Ablagerung extrazellulärer Cholesterinkristalle (Rassow 2008).

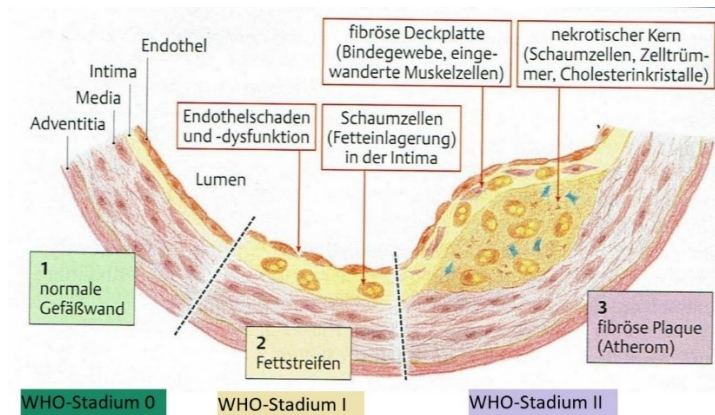


Abbildung 1: Stadien der Gefäßwandveränderung, aus Rassow 2008 (modifiziert); 1: normale Gefäßwand, 2: frühe Läsion (I, nach WHO Definition) mit Fettstreifen, 3: fortgeschrittene Läsion (II, nach WHO Definition) mit fibrösen Plaques; Die WHO gibt in ihrer Klassifikation eine dritte Stufe, die komplizierte Läsion (III), mit klinisch manifesten Folgeerkrankungen an

Aktivierte Makrophagen produzieren inflammatorische Moleküle und proteolytische Enzyme, die die aus Glattmuskelzellen bestehende Deckplatte schwächen und Zellen im Lipidkern der Plaque aktivieren können: Aus einer „stabilen“ Plaque entsteht eine vulnerable, „instabile“ Plaque (Hansson 2005). Wird die bedeckende fibröse Kappe dünner und somit verletzlicher, kann eine sog. Plaqueruptur resultieren (Abbildung 2). Reißt ein Atherom von der Gefäßwand ab, kann eine Thrombusbildung erfolgen, mit Folgeerkrankungen wie z.B. Herzinfarkt oder Schlaganfall. Andere Folgeerkrankungen sind arterielle Durchblutungsstörungen, wie z.B. periphere arterielle Verschlusskrankheit, Koronare Herzerkrankung, Angina pectoris und arterielle Thrombosen.

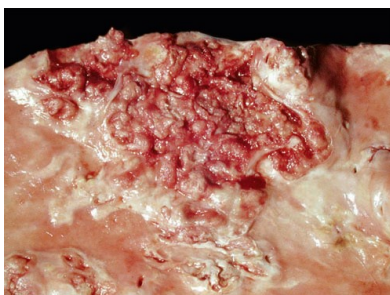


Abbildung 2: Die Makroskopie der Atherosklerose, aus Müller und Kuhlencordt 2017; es zeigt sich die aufgeworfene Oberfläche einer instabilen Plaque

### 1.2 Die Niere

#### 1.2.1 Anatomie und Funktion

Die menschliche Niere (Ren) ist ein paariges Organ, welches umgeben von einer straffen bindegewebigen Kapsel, eingebettet in Fettgewebe, im Retroperitonealraum liegt. Am Hilum der Niere befinden sich Ein- und Austrittsstellen der Leitungsbahnen sowie des Ureters. Sie lässt sich in eine außen gelegene Rindenzone und eine innere Markzone, bestehend aus den sogenannten Markpyramiden, gliedern. Die Rindenzone ist ein etwa sechs bis zehn mm breiter Streifen, direkt unter der Nierenkapsel gelegen. Die Basis der Markpyramiden ist nach außen zur Rinde gerichtet, die Spitze oder Papilla renalis zum innen gelegenen Nierenbecken. Kleinere Säuger, so auch die Maus, haben keine multipapilläre Niere wie der Mensch mit etwa sieben bis zwölf Markpyramiden, sondern eine unipapilläre Niere (Schünke et al. 2009; Lüllmann-Rauch 2009; Welsch und Deller 2011). Die mikroskopische Funktionseinheit der Niere ist das Nephron (Abbildung 5). Es besteht aus dem Nierenkörperchen (Abbildung 3, Abbildung 4), an welches sich ein unverzweigter, aus mehreren Segmenten bestehender Tubulus anschließt, der schließlich in ein Sammelrohr mündet. Ein Sammelrohr nimmt den Harn von etwa elf Nephronen auf und fusioniert immer weiter zu größeren harnableitenden Gängen, die letztendlich an der Papilla renalis in den Nierenkelch münden und hier den Harn abgeben (Lüllmann-Rauch 2009). Das Nierenkörperchen ist das Bindeglied zwischen dem Blutgefäßsystem und den harnableitenden Strukturen (Schünke et al. 2009), hier findet die Ultrafiltration des Blutes statt. In der menschlichen Niere befinden sich etwa 2,4 Millionen dieser Nierenkörperchen (Schünke et al. 2009). Ein Bestandteil ist eine vielfach gewundene Gefäßschlinge, der Glomerulus. Das Blut gelangt durch eine Arteriola afferens in den Glomerulus, passiert die Kapillarschlingen und verlässt diese wieder durch die Arteriola efferens. Diese Ein- und Austrittsstelle markiert den Gefäßpol des Nierenkörperchens.

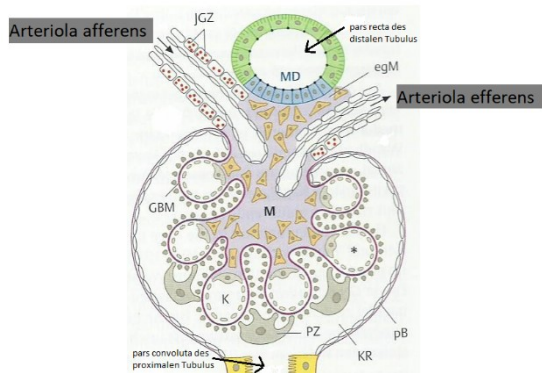


Abbildung 3: Nierenkörperchen, aus Lüllmann-Rauch 2009 (modifiziert), MD=Macula densa, JGZ=juxtaglomeruläre Zellen, egM=extraglomeruläre Mesangiumzellen, GBM=glomeruläre Basalmembran, M=Mesangium, K=Kapillare, PZ=Podozyten, pB=parietales Blatt der Bowman-Kapsel, KR=Kapselraum

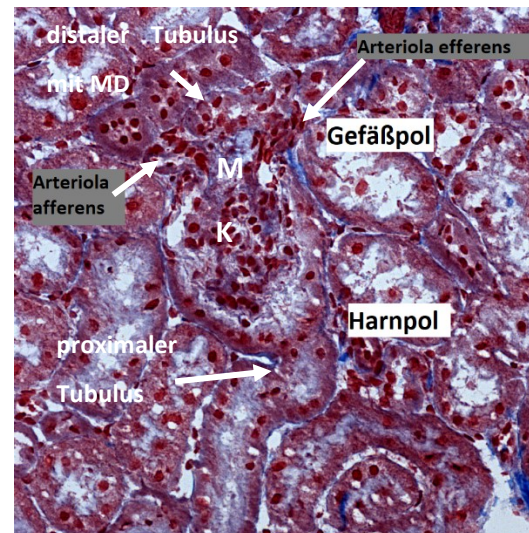


Abbildung 4: Nierenkörperchen mit angeschnittenem Gefäß- und Harnpol, Azanfärbung, NF PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH96, 200x; MD=Macula densa, M=Mesangium, K=Kapillare

Der Glomerulus ist in eine doppelwandige Bowman-Kapsel eingebettet, bestehend aus einem viszeralem und einem parietalem Blatt. Diese kann man sich vorstellen wie die Schichten eines mit der Faust eingedrückten Luftballons: Das der Faust oder dem Gefäßknäuel anliegende viszerale Blatt und das äußere parietale Blatt. Das viszerale Blatt besteht aus spezialisierten Epithelzellen, den Podozyten. Diese umgreifen mit ihren Füßchenfortsätzen die Kapillarwände des Glomerulus. Die dazwischen gelegene glomeruläre Basalmembran (GBM) ist zum einen wegen ihrer Porengröße, zum anderen wegen ihrer stark negativen Ladung eine wesentliche Barriere für Proteine (Welsch und Deller 2011). Der glomeruläre Filter oder die Blut-Harn-Schranke besteht aus dem gefensterten Kapillarendothel, der GBM und den Fortsätzen der Podozyten. Plasmaproteine und Blutzellen werden hier zurückgehalten, wohingegen Wasser und kleinere Moleküle hindurchkönnen. Der Kapselraum zwischen den beiden Blättern, in dem der Primärharn aufgefangen wird, setzt sich in das Tubulussystem fort. Der Harnpol des Nierenkörperchens sitzt dem Gefäßpol gegenüber. Die Mesangiumzellen im Innern des Nierenkörperchens geben dem Gefäßknäuel Halt und füllen den schmalen Bindegewebsraum, das Mesangium, zwischen den Kapillaren aus. Sie sind kontraktile und können phagozytieren.

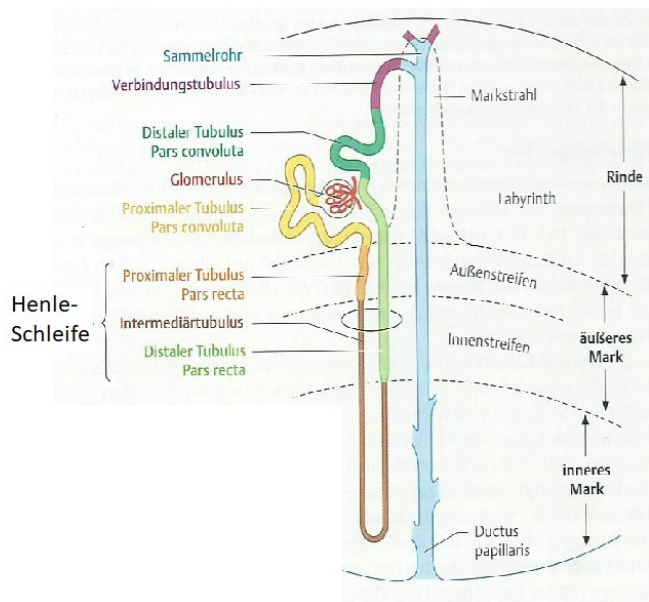


Abbildung 5: Nephron und dessen Topographie, aus Lüllmann-Rauch 2009 (modifiziert)

Das sich dem Nierenkörperchen anschließende harnableitende Tubulussystem ist in mehrere Abschnitte gegliedert (Abbildung 5). Am Harnpol setzt sich der Kapselraum zunächst in den proximalen Tubulus fort, der dann in Intermediärtubulus und distalen Tubulus übergeht. Der distale Tubulus berührt an der sogenannten Macula densa, einem kleinen Fleck am Gefäßpol, „sein“ Glomerulus. Hier findet eine tubuloglomeruläre Rückkopplung statt, indem die NaCl Konzentration gemessen wird. Ergibt die Messung einen zu hohen Natriumchlorid-Wert, wird die Zufuhr an Blut zum Glomerulus durch Gefäßkonstriktion der A. afferens gedrosselt, was in weniger Primärharn-Bildung und somit Entlastung der nachfolgenden Tubulussegmente resultiert. In der Nierenrinde liegen die Nierenkörperchen, die Konvolute von proximalem und distalem Tubulus und die Verbindungstubuli, die den Anschluss an die Sammelrohre gewährleisten. Die geraden Abschnitte des Nephrons bezeichnet man auch als Henle-Schleife (Abbildung 5). Die Blutversorgung der Niere ist ausgesprochen ausgeprägt: Alle vier bis fünf Minuten fließt das gesamte Blutvolumen hindurch (Welsch und Deller 2011). Aus der Arteria renalis, die am Hilum in die Niere eintritt, gehen die Aa. interlobares ab, die zwischen den Markpyramiden verlaufen. An der Basis der Markpyramide gehen diese in die bogenförmig an der Mark-Rinden-Grenze verlaufenden Aa. arcuatae über, deren Abzweigungen die Glomeruli versorgen. Im Mark verlaufen zudem ab- und aufsteigende Vasa recta, über die das Blut wieder in das drainierende Venensystem gelangt. Diese topographische Beziehung zwischen den Kapillarnetzen und dem Tubulussystem ist wichtig, damit das rückresorbierte Wasser gleich wiederaufgenommen werden kann. Im

proximalen Tubulussystem werden ca. 70-80% des Primärharns rückresorbiert. Der komplexe Prozess der Harnbildung geschieht durch Ultrafiltration, Sekretion und Rückresorption. Von den ca. 180l Primärharn am Tag werden nur etwa 1,5l als endgültiger Harn ausgeschieden (Welsch und Deller 2011). Grundlage für die Harnkonzentrierung ist das sog. Gegenstromprinzip. Dessen morphologisches Korrelat liegt im Nierenmark in der entgegengesetzten Stromrichtung der parallel verlaufenden Tubuli der Henle-Schleife (Harn) und den Blutgefäßen (Vasa recta). Der juxtaglomeruläre Apparat (JGA) der Niere ist morphologisches Korrelat für die bereits oben erwähnte tubuloglomeruläre Rückkopplung sowie für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Lüllmann-Rauch 2009). Zum JGA gehören die Macula densa, das extraglomeruläre Mesangium und die juxtaglomerulären Zellen, welche spezialisierte glatte Muskelzellen in der Wand des Vas afferens sind. Die extraglomerulären Mesangiumzellen stützen am Gefäßpol die ein- und austretende Arteriole. Von den juxtaglomerulären Zellen wird bei zu niedrigem Blutdruck die in Granula gespeicherte Protease Renin sezerniert. Sie spaltet das von der Leber synthetisierte und im Blut zirkulierende Angiotensinogen zu Angiotensin I. In Gefäßendothelien wird dieses wiederum vom Angiotensin Converting Enzyme zu Angiotensin II gespalten. Die Effekte von Angiotensin II sind zum einen eine Gefäßkonstriktion, zum anderen eine erhöhte Sekretion von Aldosteron in der Nebenniere, was wiederum eine vermehrte Retention von Natriumionen und Wasser bewirkt. Beides führt zu einer Erhöhung des Blutdrucks.

Die Niere übernimmt viele wichtige Funktionen des Körpers. Neben der Überwachung des Wasser- und Salzhaushaltes und der Kontrolle des Blutdrucks werden hier Hormone und Gewebefaktoren gebildet und auf entsprechende Reize hin sezerniert, wie zum Beispiel Erythropoietin, Calcitriol oder Renin. Außerdem entledigt sich der Körper in der Niere im Stoffwechsel anfallender, überschüssiger Substanzen wie Harnstoff aber auch körperfremder, oder gar toxischer Stoffe wie Medikamente und deren Metabolite.

### 1.2.2 Nephropathien und Atherosklerose

Häufig haben Nierenerkrankungen wie zum Beispiel die chronische Niereninsuffizienz (engl. chronic kidney disease = CKD) unterschiedliche Stadien von Funktionsbeeinträchtigungen sowie Ursachen (Rensing und Rippe 2014). Gemessen und eingestuft wird die Nierenleistung anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR).



Ursachen für die renale Leistungsminderung können z.B. Glomerulosklerose, welche für 90% der Endstadien des Nierenversagens verantwortlich ist, chronische Entzündungen (Pyelonephritis) und oxidativer Stress sein (Vlassara et al. 2009; Rensing und Rippe 2014). Zudem besteht eine hohe Korrelation mit anderen altersabhängigen Erkrankungen (Rensing und Rippe 2014). Diabetes verursacht erhöhten oxidativen Stress und ist der häufigste ätiologische Faktor der CKD (Rensing und Rippe 2014). Eng verknüpft sind sowohl mit den chronischen Nierenerkrankungen, als auch mit akutem Nierenversagen, die Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen einer verminderten GFR und dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Schiele 2009). Man spricht auch vom Kardiorenenalen Syndrom, da sich Erkrankungen beider Organsysteme gegenseitig negativ beeinflussen (Rensing und Rippe 2014). Die renale Dysfunktion induziert, verstärkt und treibt die CVD (Cardiovascular Disease; deutsch: Kardiovaskuläre Erkrankungen) im Allgemeinen und die Atherosklerose im Speziellen über verschiedene pathophysiologische Wege voran (Schiele 2009), während umgekehrt auch die CKD durch Atherosklerose verschlimmert wird (Chade et al. 2005). Die Hauptmechanismen über die die renale Dysfunktion die CVD beeinflusst sind Hypertonie, endotheliale Dysfunktion, Dyslipidämie, Entzündung, Aktivierung des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems und spezifische Kalzifikationen (Schiele 2009). Diese Faktoren sowie Diabetes, Übergewicht und das metabolische Syndrom tragen aber auch zur progressiven Schädigung der Niere bei, was wiederum zu einer Dyslipidämie und Ansammlung urämischer Toxine führen kann (Chade et al. 2005). Dadurch entstehende freie Radikale und proinflammatorische Faktoren können wiederum eine endotheliale Dysfunktion einleiten und somit die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen (Chade et al. 2005; Langheinrich et al. 2010). In ihrer Untersuchung an ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Mäusen fanden Langheinrich et al. einen Zusammenhang zwischen einem reduzierten intrarenalen vaskulären Volumen und systemischer Atherosklerose sowie glomerulären Abweichungen (Langheinrich et al. 2010).

### 1.3 PACAP

Das multifunktionale Neuropeptid Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) wurde zuerst im Jahr 1989 entdeckt (Vaudry et al. 2009) und gehört zur Glucagon-PACAP-VIP-Protein-Superfamilie (Abbildung 6). Diese beinhaltet neun bioaktive Peptide sowie das PACAP-Related Protein (PRP), für welches bislang keine Bioaktivität nachgewiesen werden konnte (Sherwood et al. 2000; Harmar et al. 2012). Zu den bioaktiven Peptiden gehören das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP), Sekretin, Glucagon, Glucagon-like Peptid 1 (GLP1), Glucagon-like Peptid 2 (GLP2), Growth-Hormone Releasing Hormone/Factor (GRF), Gastric Inhibitory Peptide (GIP) und das Peptid Histidin-Methionin (PHM).

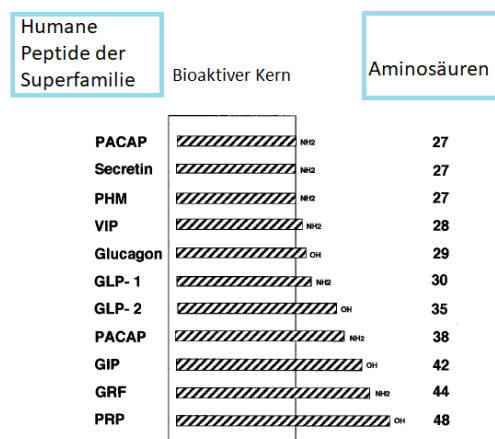


Abbildung 6: Glucagon-Protein-Superfamilie; Die Peptide der Superfamilie, die im Menschen vorkommen nach Länge der Aminosäuresequenz sortiert. Die ersten 27 Aminosäuren stellen den Hauptteil des bioaktiven Kerns der Peptide dar. Aus Sherwood et al. 2000 (modifiziert)

#### 1.3.1 Genetik und Struktur

Das humane PACAP Gen liegt in der Region P11 auf dem Chromosom 18 (Vaudry et al. 2000). Es besteht aus fünf Exons, wobei Exon 4 das PRP kodiert und Exon 5 das eigentliche PACAP Protein (Vaudry et al. 2009). Aus einer 176 Aminosäuren langen Vorläuferversion (precursor, preproPACAP) werden die zwei biologisch aktiven Formen, PACAP38 und PACAP27, benannt nach der Anzahl der Aminosäuren, prozessiert (Abbildung 7). Die Struktur der biologisch aktiven Region des PACAP Gens ist über die Evolution von Amphibien hin zu Säugetieren vollständig erhalten worden (Vaudry et al. 2000). Sie ist beim Menschen, bei Maus, Ratte und Schaf identisch (Harmar et al. 2012). PACAP38 ist in Säugetieren die dominante Form und macht hier 90% aus (Reglodi et al. 2012a). Die Aminosäuresequenz von PACAP27 hat 68% Übereinstimmung mit VIP (Vaudry et al. 2000).

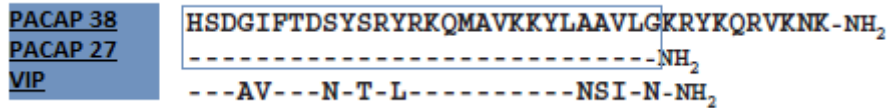


Abbildung 7: Aminosäuresequenz von PACAP27, 38 und VIP, mit blauer Umrandung ist die homologe Aminosäuresequenz von PACAP 38 und PACAP 27 markiert; aus Vaudry et al. 2009 (modifiziert)

Die Sekundärstruktur von PACAP27 weist am N-Terminus zunächst einen initialen, ungeordneten acht Aminosäuresequenzen kurzen Abschnitt auf, gefolgt von vier Domänen. Die erste Domäne an Stelle 9 bis 12 weist eine  $\beta$ -Schleife auf, während die folgenden drei an den Aminosäurepositionen 12-14, 15-20 und 22-24 helicale Strukturen aufweisen (Vaudry et al. 2000). PACAP38 spiegelt die Struktur von PACAP27 wider und weist am C-terminalen Ende zusätzlich eine weitere, durch eine scharnierartige Verbindung gekoppelte Helix auf (Wray et al. 1993).

## 1.3.2 Die PACAP-Rezeptoren

PACAP bindet an drei verschiedene Rezeptoren: PAC1, VPAC1 (VIP-Rezeptor 1) und VPAC2 (VIP-Rezeptor 2). Sie gehören zur Klasse B oder II der G Protein-gekoppelten Rezeptoren, der Sekretin-Rezeptor-Familie (Harmar et al. 2012). Diese triggern hauptsächlich über das G<sub>s</sub>-Protein die Adenylcyclase, die den Botenstoff cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) bildet und so die Signaltransduktion in Gang setzt. Die Aktivierung der Phospholipase C führt zu erhöhten Calciumspiegeln (Vaudry et al. 2000). PAC1 bindet selektiv PACAP, wobei die Affinität zu anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, zum Beispiel zu VIP stark abnimmt (Reglodi et al. 2012a). VPAC1 und VPAC2 binden PACAP und VIP mit gleich hoher Affinität (Reglodi et al. 2012a). Die N-terminale extrazelluläre Ektodomäne des PAC1-R ist die Hauptbindungsstelle für PACAP (Laburthe et al. 2007; Harmar et al. 2012). Die C-terminalen und zentralen Helices des Liganden interagieren mit der N-terminalen Ektodomäne des Rezeptors, wodurch der N-Terminus des Liganden so positioniert wird, dass er durch Kontakt mit dem Innern der Transmembranregion die Aktivierung des Rezeptors auslöst (Abbildung 8) (Laburthe et al. 2007; Harmar et al. 2012). Diese Kontaktregion ist bislang noch nicht genauer identifiziert worden (Harmar et al. 2012).

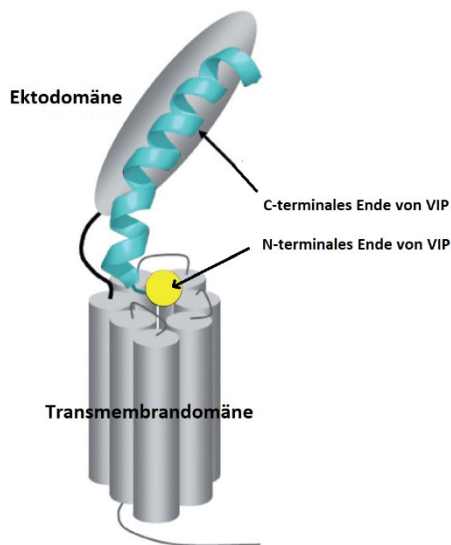


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bindung des Liganden VIP an den VPAC1-Rezeptor. Das C-terminale Ende von VIP (blau dargestellt) bindet an der N-terminalen Ektodomäne des Rezeptors (N-ted), wodurch das N-terminale Ende von VIP (gelber Kreis) in der Transmembrandomäne gefangen wird; aus (Harmar et al. 2012), modifiziert nach Laburthe et al. 2007 (modifiziert)

Für die drei Rezeptoren PAC1, VPAC1 und VPAC2 sind spezifische Agonisten und für die beiden erstgenannten auch Antagonisten gefunden und entwickelt worden. Der einzig selektive Agonist für PAC1 Maxadilan, der aus den Speicheldrüsen einer Sandfliege isoliert wurde, weist keine signifikante Sequenzhomologie mit PACAP oder VIP auf (Moro und Lerner 1997; Harmar et al. 2012).

PAC1 ist im Gehirn und im peripheren Nervensystem reichlich vorhanden, während VPAC1 und VPAC2 vor allem in peripheren Organen exprimiert werden (Vaudry et al. 2009; Eneman et al. 2016). In der humanen Niere ist VPAC1 der vorherrschende Rezeptor, er fand sich in proximalen Tubulusepithelzellen und in Podozyten (Eneman et al. 2016). Das Vorkommen von VPAC2 war auf renale Blutgefäße beschränkt, PAC1 konnte in der humanen Niere nicht nachgewiesen werden (Eneman et al. 2016). In der Rattenniere wurde PAC1 in corticalen, tubulären Epithelzellen gezeigt (Brubel et al. 2011). In glomerulären Podozyten von Mäusen wurde VPAC1 als einziger PACAP Rezeptor nachgewiesen (Sakamoto et al. 2015).

PACAP und VIP beeinflussen in vielen Organen die menschliche Pathophysiologie. Das Wissen über die Struktur und Wirkweise von Rezeptoren, Agonisten und Antagonisten ist auch für die Entwicklung hier ansetzender Pharmazeutika und somit die Therapie diverser Erkrankungen von Bedeutung. Interessant ist auch die Rolle der VIP- und PACAP-Rezeptoren in der Krebsforschung. Sie kommen in einer großen Zahl verschiedener Tumore vor und werden dort teilweise sogar überexprimiert. Hierbei kann das Wachstum der neoplastischen Läsionen verstärkt oder gehemmt werden.

Ihnen gilt hier vermehrte Aufmerksamkeit der Forschung, da sie als mögliches Ziel der Tumorthherapie dienen könnten (Moody et al. 2016).

### 1.3.3 Funktionen und biologische Effekte

PACAP und dessen Effekte werden seit seiner Entdeckung umfassend untersucht. Mittlerweile ist eine Reihe von Auswirkungen, insbesondere im zentralen Nervensystem (ZNS), aber auch in den peripheren Organen, in Tumorzellen und anderen physiologischen Vorgängen im Körper herausgearbeitet worden.

PACAP wirkt antiinflammatorisch, antiapoptotisch und antioxidativ. Einer der am gründlichsten erforschten Effekte von PACAP ist seine neuroprotektive und allgemein zytoprotektive Wirkung gegen diverse schädliche Stimuli in vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben (Reglodi et al. 2012a). Untersuchungen an KO Mäusen zeigten, dass PACAP defiziente Mäuse *in vitro* und *in vivo* sensitiver auf diverse Schädigungen reagieren (Reglodi et al. 2012b). Eine bemerkenswerte Eigenschaft von PACAP und VIP ist deren Fähigkeit eine entzündliche Reaktion durch Herunterregulieren von Zytokinen und Chemokinen, die bei inflammatorischen Stimuli z.B. von Makrophagen produziert werden, abzublocken (Abad und Tan 2018). Verschiedene Studienergebnisse legen außerdem nahe, dass PACAP Teil des endogenen Reparatursystems ist, da der Organismus mit einem erhöhten PACAP-Level auf Verletzungen und Schädigungen reagiert (Reglodi et al. 2012b). Auch wenn bewiesen ist, dass der Mangel an PACAP zu gesteigerter Apoptose, Inflammation und oxidativem Stress führt, ist dennoch nicht bekannt, ob der PACAP-Mangel an sich oder sekundäre Mechanismen oder Veränderungen in den zellulären Schutz- und Reparatursystemen für die vermehrte Vulnerabilität in PACAP defizienten Mäusen verantwortlich ist (Reglodi et al. 2012b).

Im ZNS spielt PACAP unter anderem eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, in der zentralen und peripheren Schmerzentwicklung und bei der Alzheimer Erkrankung. Es hat antidepressive Wirkung und ist Teil der angeborenen und adaptiven Immunität. PACAP und VIP spielen im ZNS wichtige Rollen bei der Kontrolle des circadianen Rhythmus, bei Lernen und Gedächtnis, sowie bei Angst und bei der Reaktion auf Stress und Hirnschädigungen (Harmar et al. 2012).

Der endogene Mangel an PACAP führt in Mäusen zu einer Reihe von Abnormitäten (Reglodi et al. 2012b; Abad und Tan 2018): Sie weisen eine höhere Sterblichkeit auf, eine

niedrigere Fertilitätsrate sowie Abweichungen im circadianen Rhythmus und Verhalten sowie respiratorische und metabolische Veränderungen. Bei VIP-PACAP-Doppel-Knockout (DKO) Mäusen zeigte sich ein deutlich vermindertes Wachstum und eine erhöhte Sterblichkeit (Niewiadomski et al. 2008).

### 1.3.4 PACAP im Immunsystem

PACAP und VIP spielen im Immunsystem und Entzündungsprozessen aufgrund ihrer oben genannten Eigenschaften eine wichtige Rolle. In verschiedenen Tierstudien zeigte sich eine Behandlung mit PACAP bei chronisch entzündlichen Krankheitsmodellen in einer abgemilderten Symptomatik (Vaudry et al. 2009). Ein Ziel, an dem PACAP in der Immunantwort angreift sind u.a. Makrophagen und Monozyten. Auf diesen wird der PAC1-Rezeptor konstitutiv exprimiert (Harmar et al. 2012).

Tumornekrosefaktor alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6) sind proinflammatorische Zytokine.  $\text{TNF}\alpha$  ist bei der unspezifischen Immunantwort bedeutend und kann Entzündungsreaktionen im Körper auslösen oder verstärken. Beim Bekämpfen einer Entzündung spielt der Übergang von der unspezifischen zur spezifischen Immunantwort eine zentrale Rolle (Jones 2005). Dieser Wechsel ist bei IL-6-Defizienz fehlerhaft. Das Zytokin IL-6 tritt durch Rekrutierung, Aktivierung und Apoptose von Lymphozyten als ein wichtiger Regulator dieser Phase hervor (Jones 2005). Außerdem aktiviert es die Akute-Phase-Proteine.

In unstimulierten Makrophagen hemmt PACAP die  $\text{TNF}\alpha$  Freisetzung und steigert die IL-6 Produktion durch Aktivierung der Proteinkinasen A und C (Martinez et al. 1998; Delgado et al. 1999). In Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen jedoch hemmt PACAP sowohl die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  als auch die von IL-6 und IL-12, was die Vermutung nahelegt, dass PACAP als eine Art regulierender Faktor vor einer zu massiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine schützt (Martinez et al. 1998; Delgado et al. 1999). Die antiinflammatorische Wirkung von PACAP begründet sich also zum einen in einer Hemmung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$  und zum anderen in der Stimulation des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Vaudry et al. 2000).

### 1.3.5 PACAP im kardiovaskulären System

Auch im kardiovaskulären System zeigt PACAP eine Reihe von Auswirkungen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Gefäßwände reich mit PACAP

enthaltenden Fasern innerviert sind und sich in arteriellen Gefäßen eine hohe Dichte an PACAP-Bindungsstellen nachweisen lässt (Huang et al. 1993; Vaudry et al. 2009). PACAP und VIP gelten als hochpotente vasorelaxierende Faktoren (Huang et al. 1993; Ross-Ascutto et al. 1993; Vaudry et al. 2009; Ivic et al. 2017). Begründet liegt der vasodilatatorische und hypotensive Effekt im Angreifen von PACAP in der Mikrozirkulation. PACAP aktiviert die Adenylylcyclase, indem es am PAC1-Rezeptor von glatten Muskelzellen von Arterien bindet (Erdling et al. 2013; Vamos et al. 2014). In einer aktuellen Publikation von Ivic et al. zeigte PACAP-38 eine signifikant größere vasodilatatorische Wirkung als PACAP-27 und VIP (Ivic et al. 2017). Die Rolle des Endothels beim PACAP-induzierten vasodilatatorischen Effekt in Gefäßen ist noch nicht abschließend geklärt: Es gibt Studienergebnisse, die von einer Endothel-unabhängigen PACAP-induzierten Vasodilatation in Aorta und Koronararterien von Kaninchen berichten (Warren et al. 1991; Kästner et al. 1995), jedoch auch eine konträre Studie, die zeigt, dass die Entfernung des Endothels die vasodilatatorische Antwort auf PACAP in Pulmonalarterien von Meerschweinchen aufhebt (Cardell et al. 1997; Vaudry et al. 2009).

### 1.3.6 PACAP in der Niere und den Harnwegen

PACAP ist ein potentes nephroprotektives Peptid, das sowohl endogen als auch exogen zugeführt seine Wirkung entfaltet (Brubel et al. 2011). PACAP zeigte *in vitro* unter anderem einen schützenden Effekt auf tubuläre Zellen bei oxidativem Stress und Hypoxie (Horvath et al. 2010; Reglodi et al. 2012a). *In vivo* konnten die protektiven Eigenschaften beispielsweise bei Ischämie/Reperfusion, diabetischer Nephropathie und Gentamicin-induzierter Schädigung nachgewiesen werden (Szakaly et al. 2011). Die Gabe von PACAP führte zu einer Verbesserung der renalen Funktion, verminderte tubulointerstitielle Schäden und führte zu einer verminderten Expression von inflammatorischen und fibrotischen Markern (Reglodi et al. 2012a; Eneman et al. 2016). Hauptsächlich scheinen der antiapoptotische, der antiinflammatorische und der antioxidative Effekt von PACAP den nephroprotektiven Mechanismus auszumachen (Reglodi et al. 2012a). Mäuse, denen das PACAP Protein fehlt, reagieren verwundbarer in einer Vielzahl von Geweben auf verschiedene schädigende Einflüsse (Reglodi et al. 2012a). In der Rattenniere liegt der PAC1 Rezeptor vornehmlich in den corticalen

tubulären Epithelzellen, hier stellt er die morphologische Basis für den tubuloprotektiven Effekt des Peptids dar (Brubel et al. 2011).

PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine vergrößerte Kapazität der Harnblase, mehr Harnmenge pro Miktion und längere Intervalle zwischen dem Wasserlassen (Ojala et al. 2018; May und Vizzard 2010). In einem Cyclophosphamid-induzierten Zystitis-Modell konnte die Blockade des PACAP/PAC1-Signalwegs im Miktionsreflex die Häufigkeit des Wasserlassens senken (Ojala et al. 2018).

## 1.4 Apolipoprotein E

### 1.4.1 Lipoproteine und deren Stoffwechsel

Da Lipide wegen ihres meist hydrophoben Molekülcharakters nicht frei im Blut transportiert werden können, benötigen sie hierfür Trägerproteine. Mittel- und kurzkettige Fettsäuren sind amphipatisch und bilden diesbezüglich eine Ausnahme. Sie können sich frei im Blut gelöst ohne „fremde Hilfe“ bewegen. Langkettige Fettsäuren sind im Blut an Albumin gebunden. Triacylglyceride (TAG), Phospholipide, Cholesterin und dessen Ester sowie fettlösliche Vitamine hingegen benötigen zum Transport in wässriger Umgebung Hilfe von den Apolipoproteinen. Die kugelförmigen Aggregate aus hydrophobem Lipidkern (vorwiegend TAG und Cholesterinester) und umgebender Hülle aus amphiphilen Proteinen nennt man Lipoproteine. Die Vermittler zwischen den zu transportierenden hydrophoben Lipiden und dem polaren, hydrophilen Blut sind die Apolipoproteine. Gäbe es diese Lipoprotein-Komplexe nicht, würden die TAG im Blut akkumulieren und Embolien verursachen (Koolman und Röhm 2009).

Anhand ihrer Dichte werden die Lipoproteine in fünf Klassen eingeteilt (siehe Tabelle 1). Man unterscheidet die Chylomikronen, die VLDL (Very Low Density Lipoproteins), IDL (Intermediate Density Lipoproteins), LDL und HDL (High Density Lipoproteins). Der Proteinanteil der Lipoproteine liegt zwischen 1% bei den Chylomikronen und über 50% bei den HDL (Koolman und Röhm 2009).



## Einleitung

Lipoprotein	Durchmesser	Dichte	TAG-Anteil	Funktion	Wichtige Apolipoproteine
Chylo-mikronen	75-1200nm	<0,95g/ml	~90%	Transport der Nahrungs-TAG vom Darm → Leber	ApoB-48 ApoC-II ApoE ApoA-I
VLDL	30-70nm	ca. 0,95g/ml	55%	Transport endogener TAG, Leber → Gewebe	ApoB-100 ApoC-II ApoE
IDL	20-30nm	ca. 1g/ml	20%	Entstehen beim Abbau von VLDL	ApoB-100
LDL	20nm	1,02-1,06g/ml	6%	Entstehen beim Abbau von IDL, Cholesterintransport im Blut → Gewebe/Peripherie	ApoB-100
HDL	<10nm	Bis zu 1,2g/ml	4%	Reverser Cholesterintransport von peripheren Geweben → Leber	ApoA-I ApoA-II ApoE

*Tabelle 1: Übersicht über die Lipoproteine, Einteilung nach ihrer Dichte, angelehnt an Rassow 2008 und Koolman und Röhm 2009*

Man unterscheidet im Lipoproteinstoffwechsel (Abbildung 9) einen exogenen und einen endogenen Weg sowie den reversen Cholesterintransport (Wächtershäuser und Stein 2007).

### Der exogene Weg

Die über die Nahrung aufgenommenen Lipide werden zu 95% im Duodenum und im Anfangsteil des Jejunum aufgenommen (Behrends 2010). Die in Mizellen emulgierten Lipidspaltprodukte werden freigesetzt, sobald die Mizelle mit der Enterozytenmembran in Kontakt kommt. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch Diffusion (z.B. Glycerin und kurzkettige Fettsäuren) oder mittels Transportproteinen (Cholesterin, langkettige Fettsäuren). Aus Glycerin und drei Fettsäuren werden TAG resynthetisiert. TAG, Phospholipide, Cholesterinester, Cholesterin und fettlösliche Vitamine werden mit den Apolipoproteinen A-I, ApoB48 und ApoA-II zu Chylomikronen verbunden. Sie gelangen durch Exozytose aus der Zelle hinaus und gelangen über die Lymphe durch den Ductus

thoracicus zum linken Venenwinkel und treten hier in die Blutbahn ein. Auf der Endothelzellmembran der Blutkapillaren befindet sich die Lipoproteinlipase (LPL), die aktiviert durch den Cofaktor ApoC-II, die TAG der Chylomikronen spaltet. Dadurch entstehen wieder freie Fettsäuren, die von der Muskulatur und dem Fettgewebe resorbiert werden können. Die Chylomikronen verlieren schnell an TAG und werden zu sogenannten Chylomikronen-Remnants. ApoE vermittelt nun deren Endozytose in die Hepatozyten durch den membranständigen LDL-Rezeptor (LDL-R).

### Der endogene Weg

Die Leber verpackt im Nüchternzustand des Körpers selbst synthetisierte TAG sowie Cholesterin in VLDL. Die Überlebenszeit der VLDL im Blut beträgt nur etwa 20 Minuten (Rassow 2008). ApoE vermittelt wie auch bei den Chylomikronen-Remnants den Abbau an der LPL. Die VLDL werden so zügig zu IDL, oder auch VLDL-Remnants, die reich an ApoE und Cholesterinestern sind, abgebaut. Etwa die Hälfte der IDL wird wieder in die Leber aufgenommen und hier weiterverarbeitet, die anderen werden durch die hepatische Lipase zu LDL umgebaut. Der relative Cholesterinanteil steigt beim Umbau von VLDL zu IDL und weiter zu LDL, bei dem er ca. 45% beträgt, an. Die assoziierten Apolipoproteine werden zunehmend abgegeben. Das am LDL verbleibende ApoB-100 vermittelt die Endozytose des gesamten LDL-Partikels über den LDL-R in die Zielzelle. Die Hauptaufgabe der LDL ist es, Cholesterin in die Peripherie zu verteilen.

Der LDL-R wird abhängig von der intrazellulären Cholesterinkonzentration exprimiert. Interessant ist auch, dass die IDL aufgrund ihres hohen ApoE-Gehalts eine 10fach höhere Affinität zum LDL-R haben, als die LDL selbst (Wächtershäuser und Stein 2007). Bei der relativ seltenen Hyperlipoproteinämie Typ II, auch familiäre Hypercholesterinämie genannt, ist der LDL Rezeptor defekt. Dies resultiert in massiv erhöhten Plasma-Cholesterinspiegeln und kann schon im Kindesalter zu einer schweren Atherosklerose führen (Rassow 2008).

### Der reverse Cholesterintransport

Die HDL sind die kleinsten Lipoproteine mit der größten Dichte. Sie entstehen nicht intrazellulär sondern bilden sich im Blut (Rassow 2008). Die HDL sammeln überflüssiges Cholesterin aus der Peripherie und dem Blut ein und transportieren es zu Zielzellen, die Steroidhormone produzieren, oder zurück zur Leber. ApoE vermittelt die Endocytose der HDL in der Leber (Koolman und Röhm 2009). Zirkuliert also viel HDL im Blut, welches

das überschüssige Cholesterin aufnimmt und zurück zur Leber bringt, ist dies prognostisch günstig.

Cholesterin kann im menschlichen Stoffwechsel nicht wieder zu einem Acetyl-Coenzym A abgebaut werden (Rassow 2008). Überschüssiges Cholesterin wird zu einem geringen Anteil frei und überwiegend als Gallensalz gebunden ausgeschieden. Im Ileum werden beide Formen jedoch größtenteils wieder rückresorbiert, weshalb es für den Körper schwierig ist, Cholesterin endgültig aus dem Organismus zu entfernen. Es zirkuliert im enterohepatischen Kreislauf. Bedingt durch die fettreiche Ernährung der Industrieländer wird dem Körper übermäßig viel Cholesterin zugeführt. Es akkumuliert im Körper und trägt erheblich zum Atherosklerose-Risiko bei (Rassow 2008). Wird die LDL-Sättigungskonzentration, die bei 200mg/dl liegt, überschritten, wird das LDL über den sog. „Scavenger pathway“ verstoffwechselt (Wächtershäuser und Stein 2007). Insbesondere Makrophagen am Gefäßendothel nehmen über „Scavenger Rezeptoren“ LDL und überschüssiges Cholesterin auf und werden so zu Schaumzellen: ein entscheidender Schritt bei der Atherosklerose Entstehung.

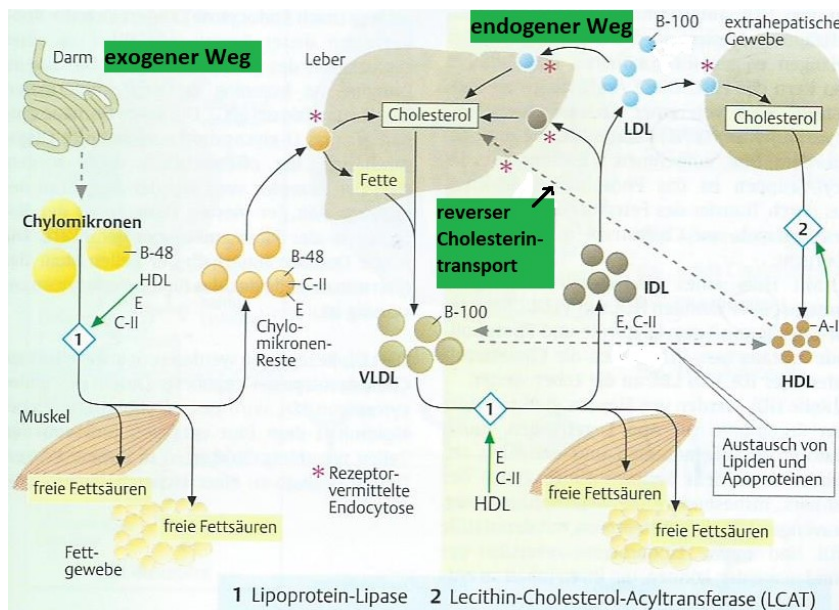


Abbildung 9: Der Lipoprotein-Stoffwechsel im Überblick, aus Koolman und Röhm 2009 (modifiziert); HDL=High Density Lipoprotein, IDL=Intermediate Density Lipoprotein, LDL=Low Density Lipoprotein, VLDL=Very Low Density Lipoprotein

## 1.4.2 Die Apolipoproteine

Die Funktion der Apolipoproteine besteht zum einen darin Lipide im Blutweg mit ihrer komplexierenden Form wasserlöslich zu machen. Zum anderen sind sie Vermittler zwischen den Lipoprotein-Komplexen und deren Rezeptoren an den Zielzellen und

schließlich fungieren sie zusätzlich auch als Aktivatoren für die Lipoprotein-abbauenden Enzyme (ApoA-I → LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase), ApoC-II → LPL).

### 1.4.2.1 Apolipoprotein A

Es gibt die Untergruppen ApoA-I, A-II, A-IV und A-V. ApoA-I wird in Leber und Darm synthetisiert (Mahley et al. 1984; Rassow 2008) und gilt als klassischer Aktivator der LCAT (Wächtershäuser und Stein 2007). Das in 2001 von Pennachio et al. und Vliet et al. entdeckte Protein ApoA-V wird in der Leber synthetisiert (van der Vliet, Hendrik N. et al. 2001; Pennacchio et al. 2001). Indem ApoA-V Chylomikronen und VLDL der Lipolyse durch die an der Endothelzellwand gebundene LPL zuführt, reduziert es die Triglyceridlevel im Blutplasma (Merkel et al. 2005). Die Beeinflussung der Plasma-TAG durch ApoA-V zeigt, dass eine Verbindung zur Entstehung von CVD besteht (Tai und Ordovas 2008).

### 1.4.2.2 Apolipoprotein B

Hierzu gehören das ApoB-100 und das ApoB-48. Das ApoB-100 gehört zu den größten Proteinen, die im menschlichen Genom kodiert werden (Rassow 2008) und wird von den Hepatozyten synthetisiert. ApoB-48 ist eine verkürzte Protein-Version desselben Gens. ApoB-100 vermittelt über den LDL-R die Aufnahme der LDL in die Leber, ApoB-48 hingegen ist dem exogenen Lipoprotein-Stoffwechsel zugehörig.

### 1.4.2.3 Apolipoprotein C

Es gibt die Untergruppen ApoC-I, ApoC-II und ApoC-III. Sie sind wichtige Effektoren der LPL und kommen auf HDL, Chylomikronen und VLDL vor. Sie werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert. ApoC-I und ApoC-III aktivieren die LCAT und ApoC-II die LPL. Wie in einer aktuellen prospektiven Studie gezeigt werden konnte, sind erhöhte ApoC-III Level deutlich mit einem erhöhtem Risiko für Atherosklerose der Koronararterien assoziiert (van Capelleveen et al. 2017).

### 1.4.2.4 Apolipoprotein D

Das ApoD kommt in den meisten Organen der Säuger vor, wobei in Niere und Nebennieren die höchsten Werte an ApoD mRNA nachgewiesen werden konnten

(Rassart et al. 2000). ApoD hat evolutionär keine Beziehung zu einem der anderen Apolipoproteine (Perdomo und Dong 2009; Ganfornina et al. 2010). Es transportiert kleine hydrophobe Moleküle wie Arachidonsäure, Cholesterin und Steroidhormone für den Metabolismus und für Signalwege (Rassart et al. 2000).

### 1.4.2.5 Apolipoprotein E

Das ApoE ist ein vergleichsweise kleines Protein von 34 Kilodalton und besteht aus 299 Aminosäuren (Mahley 2017). Das Gen liegt auf Chromosom 19. Hauptsyntheseort des ApoE sind die Hepatozyten, gefolgt von Gehirn und anderen Organen wie Nebennieren, Hoden, Haut Niere, Milz, Fettgewebe sowie von Makrophagen (Huang und Mahley 2014). Es kommt auf VLDL, IDL, den Chylomikronen-Remnants und auf HDL vor.

Das Protein besteht aus zwei strukturellen Domänen: einem N-Terminus (Aminoterminal Domäne) und einem C-Terminus (Carboxyl-terminal Domäne), verbunden durch eine Aminosäuresequenz aus 20-30 Aminosäuren. Der N-Terminus, welcher aus vier Helices besteht, stellt etwa 2/3 des Proteins dar (1-191) und enthält die Rezeptor-Bindungsstelle an Stelle 136-150, das Carboxylende enthält die Lipid-Binde-Region an den Aminosäurestellen 240-270 (Mahley 2017).

Es gibt drei Isoformen des Apolipoproteins E: E2, E3 und E4. Dieser Polymorphismus entsteht durch drei verschiedene Allele des Gens. Das Allel für ApoE3 stellt mit 65-70%iger Prävalenz in der Bevölkerung die häufigste Form dar und wird daher als die „normale“ Form angesehen (Abbildung 10) (Huang und Mahley 2014; Mahley 2017). ApoE2 (Prävalenz 8-10%) und ApoE4 (15-20%) unterscheiden sich von der Normalform E3 (Cys<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>) durch einzelne Aminosäureabweichungen, ausgelöst durch eine einzelne veränderte Base im ApoE-Gen. Beim E2 befindet sich an Position 112 ein Cystein statt eines Arginins (Cys<sup>112</sup>, Cys<sup>158</sup>), beim ApoE4 ist an Position 158 statt eines Cysteins die Aminosäure Arginin vorhanden (Arg<sup>112</sup>, Arg<sup>158</sup>). ApoE2 und ApoE3 kommen vor allem in Assoziation mit den kleinen phospholipidreichen HDL vor, ApoE4 findet sich bevorzugt an großen, triglyceridreichen VLDL (Greenow et al. 2005; Huang und Mahley 2014). Die Bindungsaffinität zum LDL-R von ApoE2 beträgt weniger als 2% von der des ApoE3 und des ApoE4 (Huang und Mahley 2014).

Ein wichtiger Unterschied zwischen ApoE4 auf der einen und -E2 und -E3 auf der anderen Seite besteht in der bereits oben genannten Aminosäure Arginin statt Cystein

an Position 112 (Abbildung 10). Bedingt durch Cystein<sup>112</sup>, liegt eine Seitenkette der Aminosäure Arginin<sup>61</sup> zwischen der zweiten und dritten Helix des N-Terminus verborgen. Beim E4 allerdings geht das Arginin<sup>112</sup> eine Bindung mit Glutaminsäure<sup>109</sup> ein, was dazu führt, dass die Seitenkette am Arginin<sup>61</sup> nicht verborgen ist, sondern an der Oberfläche exponiert wird und daher mit Glutaminsäure<sup>255</sup> eine Bindung eingehen kann. Diese Wechselwirkung zwischen den Domänen von N- und C-Terminus führt zu einer schwerwiegenden strukturellen Veränderung des Proteins, was in der abweichenden Präferenz für bestimmte Lipoproteine sowie in den neuropathologischen Konsequenzen von ApoE4 resultiert (Mahley 2017).

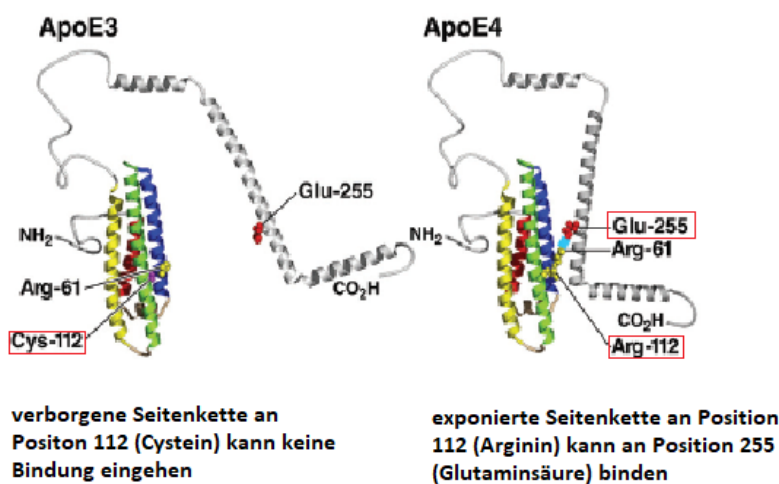


Abbildung 10: Die Struktur von ApoE3 und ApoE4, aus Mahley 2017 (modifiziert)

Als Vermittler der Endozytose von Lipoproteinen hat ApoE eine wichtige Funktion im Lipidstoffwechsel. Neben den Chylomikronen-Remnants werden so VLDL, IDL und HDL ApoE-vermittelt in die Leber aufgenommen. Dies geschieht durch den LDL-R und das LDL-Rezeptor-verwandte Protein. Beide gehören zur selben Proteinfamilie.

ApoE spielt im Nervensystem eine wichtige Rolle bei der Reparatur und Regeneration. Bei Verletzungen von Nerven wird vermehrt ApoE exprimiert. Durch die Umverteilung von Lipiden unterstützt es den Wiederaufbau und die Membransynthese (Mahley 2017). Dadurch bedingt, dass E2 eine nur mangelhafte Bindung an den LDL-R bewerkstelligen kann, ist E2 mit der genetischen Typ III Hyperlipoproteinämie vergesellschaftet sowie mit einer frühzeitigen, beschleunigten Atherosklerose (Mahley 2017). E2 wirkt protektiv gegen die Entwicklung einer Alzheimer Erkrankung (Mahley 2017). ApoE4 erhöht das Risiko für CVD und ist mit erhöhten Konzentrationen an LDL assoziiert (Mahley 2017). Außerdem ist das E4 Allel mit der Alzheimer Krankheit verknüpft, es erhöht das Risiko

und setzt das Erkrankungsalter herab (Mahley 2017). In einer Studie an älteren, kognitiv gesunden Menschen wurde u.a. untersucht, inwieweit die ApoE3 und ApoE4 Allele Einfluss auf das Gedächtnis und die Ablagerung der neurotoxischen  $\beta$ -Amyloide haben, die in senilen Plaques vorkommen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung und dem schlechteren episodischen Gedächtnis gezeigt werden, am deutlichsten in der Gruppe der homozygoten ApoE4 Allelträger (Lim et al. 2017).

### 1.4.2.6 ApoE und Atherosklerose

ApoE spielt eine protektive Schlüsselrolle bei der Entstehung der Atherosklerose (Greenow et al. 2005). In gesunden Gefäßwänden gibt es keine ApoE Expression. In atherosklerotischen Plaques wird vermehrt ApoE produziert, vermutlich hauptsächlich von lokalen Makrophagen (Rosenfeld et al. 1993). Sowohl das hepatische, als auch das lokal produzierte ApoE der Makrophagen hat einen antiatherogenen Effekt (Greenow et al. 2005). Durch die ApoE vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber werden deren Plasmakonzentrationen gesenkt. Somit nimmt die Verfügbarkeit von Lipiden für die Gewebe ab. Außerdem stimuliert ApoE den Cholesterin-Efflux aus Schaumzellen in atherosklerotischen Läsionen und reguliert inflammatorische Prozesse (Greenow et al. 2005). ApoE-defiziente Mäuse entwickeln eine Atherosklerose, wobei das Ausmaß der Erkrankung gemindert wird, wenn die Tiere das Protein reexprimieren (Greenow et al. 2005).

### 1.4.2.7 Das ApoE<sup>-/-</sup> Mausmodell

Im Jahr 1992 wurde von zwei AG gleichzeitig erstmals von der Entwicklung ApoE-defizienter Mäuse berichtet (Zhang et al. 1992; Plump et al. 1992). Dieses Mausmodell wurde für Vergleichsstudien der Atheroskleroseforschung zum Goldstandard, da hiermit die Relevanz bestimmter Einflussfaktoren auf die Atherosklerose Entstehung vergleichend analysiert werden können (Fazio und Linton 2001). Bedingt durch den ApoE-Mangel der Tiere häufen sich schon unter normaler Fütterung die Lipoproteine im Blut an, was zu einer ausgeprägten Hypercholesterinämie führt. Unter Fütterung einer fettreichen „Western-Type Diet“ zeigt sich diese noch extremer und die Entstehung und Progression der atherosklerotischen Gefäßveränderungen wird beschleunigt

(Nakashima et al. 1994; Fazio und Linton 2001). Das Erscheinungsbild und die Verteilung der Läsionen in diesem Mausmodell sind denen im Menschen sehr ähnlich: Im gesamten arteriellen Gefäßbaum vorkommend, können hier Läsionen der Stadien der fatty streaks bis zu den fibrösen Plaques, mit der charakteristischen inflammatorisch-fibroproliferativen Gewebsreaktion beobachtet werden (Nakashima et al. 1994). Mittlerweile sind auch andere Mausmodelle für die Atheroskleroseforschung kommerziell erhältlich, beispielsweise LDL-Rezeptor-KO Mäuse.

Als Kontrollgruppen- oder Wildtyp-Mäuse, sowie als Ausgangs-Tiere für weitere Kreuzungen und KO werden oft C57BL/6 Mäuse verwendet. Ende der 60er und 70er Jahre konnte erstmals gezeigt werden, dass bestimmte gezüchtete Mauslinien als Reaktion auf eine hochfetthaltige Fütterung atherosklerotische Läsionen entwickeln und dafür anfälliger als andere sind (Fazio und Linton 2001). Eine solche anfälligere Linie waren die C57BL/6 Mäuse. Sie entwickelten Läsionen mit Eigenschaften atherosklerotischer Veränderungen allerdings nur am Beginn der Aorta und den Klappensegeln der Aortenklappe (Nakashima et al. 1994). Das Fehlen einer vollständigen Korrelation zwischen Anfälligkeit für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und den Plasma Cholesterin-Leveln legt die Vermutung nahe, dass noch andere genetische Einflussfaktoren in den Prozess involviert sind (Fazio und Linton 2001), die weiter untersucht werden müssen und zentraler Gegenstand der Forschung sind.



### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Einfluss von PACAP bzw. PAC1 bzw. deren Defizienz auf die Morphologie und Inflammation der Niere bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht werden. Zusätzlich soll der Einfluss der Verabreichung eines cholesterinangereicherten Futters (CED) auf die Morphologie der Niere untersucht werden. Es werden folgende Normalfuttergruppen untersucht: **1.** ApoE<sup>-/-</sup>, **2.** PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, **3.** PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> sowie die CED-Gruppen: **1.** ApoE<sup>-/-</sup>, **2.** PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, **3.** PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> **4.** Wildtyp (WT) Mäuse.

Untersucht werden die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zum WT sowie die DKO Mäuse PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> im Vergleich zu den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Innerhalb der Genotypen werden die Zielparameter zusätzlich auf den unterschiedlichen Einflussfaktor des Futtertyps CED oder Normalfutter (NF) hin untersucht.

Es soll folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

Hat ApoE-, PACAP- bzw. PAC1-Defizienz und/oder cholesterinangereicherte Nahrung einen Einfluss auf die Morphologie des Nierenkortexes, insbesondere die Anzahl und Größe der Nierenkörperchen?

Findet sich eine fibrotische Reaktion im Nierenkortex bei den o.g. verschiedenen Genotypen und Futtertypen?

Zeigt sich bei den Mäusen nach 20 Wochen CED im Vergleich zu NF eine vermehrte inflammatorische Reaktion durch Monozyten-/Makrophagen-Infiltration und/oder eine vermehrte Zahl an Zellen, die inflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF $\alpha$  exprimieren?

## 2 *Material und Methoden*

### 2.1 Geräte und Material, Chemikalien, Antikörper, Software

#### 2.1.1 Geräte und Material

Cholesterinester-Quantifizierungs-Kit ab65359	Firma Abcam, Cambridge, UK
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Eppendorf Pipetten, Finnpietten	Eppendorf, Hamburg und Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Filterpapier 595 ½	Schleicher & Schüll BioScience GmbH, Dassel
Kamera AxioCam Hrc	Zeiss, Oberkochen
Kryotom Hyrax C60	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop CX21LED	Olympus, Japan
Magnetrührplatte	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axio Imager M2	Zeiss, Oberkochen
Mikrotiterplatten Lesegerät Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Objektträger Super Frost Plus	Menzel, Braunschweig
PAP-liquid-blocker Pen	Cedarlane, Burlington, Kanada
pH-Meter CyberScan 510	Eutech Instruments, Singapur
Rüttler Reax2000	Heidolph, Schwabach
Rüttelplatte Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Triglycerid-Quantifizierungs-Kit ab65336	Firma Abcam, Cambridge, UK
Waage	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

#### 2.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Anilinblau	Riedel de Haen, Seelze-Hannover
Anilinöl	Merck, Darmstadt
Azokarmin G	Chroma, Münster

---

DAB-Peroxidase Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Goat Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hämalaun-Lösung nach Mayer, sauer	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaisers Glycerol Gelatine	Merck, Darmstadt
Normales Schweineserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oil Red O Farbstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):	
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Phosphatase Substrat	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA
Phosphorwolframsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
PolyFreeze, Tissue Freeze Medium, Clear	Polysciences Inc., Warrington, USA
Roti® Histokitt Eindeckmedium	Roth, Karlsruhe
Shandon Immu-Mount™ Eindeckmedium	Richard-Allan Scientific, Michigan, USA
Sigma Fast™ FastRed TR/Naphthol Farbtabletten	Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA
Tartrazin	Merck, Deutschland
TissueTek O.C.T.™. Compound	Sakura, Tokio, Japan

### 2.1.3 Antikörper

#### Primärantikörper:

MOMA-2	Ratte anti-Maus, monoklonal, MCA 519G, Firma Serotec bzw. BioRad
F4/80	Ratte anti-Maus, monoklonal, MCA 497GA Firma BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
TNF $\alpha$	Kaninchen anti-Maus, polyklonal, ab6671

Firma Abcam, Cambridge, UK

IL-6

Kaninchen anti-Maus, polyklonal, ab 6672

Firma Abcam, Cambridge, UK

### Sekundärantikörper:

Ziege anti-Ratte, AP-gekoppelt, Fa. Jackson (Code 112-055-003, Lot 943 63)

Ziege anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt, Fa. Linaris (ZRH 1158, Lot 520 703 13)

### 2.1.4 Software

AxioVision 4.8.2 (Mikroskop mit Kamera)

Citavi Version 5.5.0.1

ImageJ, Version 1.51f

Microsoft Office Excel 2016

Microsoft Office Word 2016

Microsoft Office Powerpoint 2016

SigmaPlot 12.0

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiere und Versuchsaufbau

C57/BL6 WT Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt

ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt

Nomenklatur: B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc/Crl</sup> (congenic), Charles River Laboratories.

Der ApoE<sup>-/-</sup> Stamm liegt auf einem C57/BL6 genetischen Hintergrund vor (Bonaterra et al. 2012) und ist bei Normalfütterung unbelastet. Homozygote ApoE<sup>tm1Unc</sup> Mäuse zeigen unabhängig vom Geschlecht erhöhte Plasma-Cholesterinspiegel und Plasma-Triglyceridspiegel, welche die Tiere aber nicht belasten.

Fettablagerungen im proximalen Bereich der Aorta entwickeln sich ab dem 3. Lebensmonat. Ab dem Alter von über 17 Monaten zeigen sich xanthomatöse Läsionen im Gehirn, die aus kristallinen Cholesterin-Ablagerungen, Lipidglobulinen und Schaumzellen bestehen. In unserem Versuchsverlauf wird das Alter von 17 Monaten bei weitem nicht erreicht.

Begründung: Bezüglich des Alters zeigen eigene Vorarbeiten, dass der Phänotyp bis zum Ende unseres Beobachtungszeitraums (30 Wochen) unauffällig bleibt.

PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt. Der PACAP<sup>-/-</sup> Stamm liegt auf einem C57/BL6 genetischen Hintergrund vor und ist nicht belastet (Hamelink et al. 2002).

PAC1<sup>-/-</sup> Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt. Der PAC1<sup>-/-</sup> Stamm liegt auf einem C57/BL6 genetischen Hintergrund vor und ist nicht belastet (Otto et al. 2001a; Mustafa et al. 2015).

PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt

Diese Mauslinie wurde durch Kreuzung der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse mit PACAP<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert (Zuchtbeginn Januar 2013). Eine Belastungseinstufung durch uns zeigt keine sichtbaren Belastungen.

PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse, ♂ + ♀, 10 Wochen alt

Diese Mauslinie wurde durch Kreuzung der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse mit PAC1<sup>-/-</sup> Mäusen generiert (Zuchtbeginn März 2013). Eine Belastungseinstufung durch uns zeigt keine sichtbaren Belastungen.

### Fütterung und Futtermittel:

Die Fütterung von einer mit Cholesterin angereicherten „Western-Type Diet“ mit einem Fettanteil von 21% (CED, TD.88137, Harlan Teklad) erfolgte ab einem Alter von zehn Wochen über einen Zeitraum von 20 Wochen. Die Vergleichsgruppe erhielt entsprechend Haltungsfutter mit 6,8%igem Fettanteil (NF, Teklad global 16% Protein Rodent Diet, Harlan Teklad).

Genotyp	Futtermittel	Tierzahl
<b>ApoE<sup>-/-</sup></b>	NF: Teklad global 16% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad	9
	CED: Western-Type Diet; TD.88137; Harlan Teklad	8
<b>PACAP<sup>-/-</sup> / ApoE<sup>-/-</sup></b>	NF: Teklad global 16% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad	7
	CED: Western-Type Diet; TD.88137; Harlan Teklad	8
<b>PAC1<sup>-/-</sup> / ApoE<sup>-/-</sup></b>	NF: Teklad global 16% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad	8
	CED: Western-Type Diet; TD.88137; Harlan Teklad	9
<b>Wildtyp-Mäuse (WT)</b>	CED: Western-Type Diet; TD.88137; Harlan Teklad	6

*Tabelle 2: Anzahl der Tiere nach Genotyp und Futtermittel*

### 2.2.2 Gewinnung und Präparation des Gewebes und der Blutproben

Die Tiere wurden nach Ablauf der 20 Wochen Fütterungszeit mit Isofluran (Forene Abbott, Schweiz) betäubt und mittels intraperitonealer Applikation eines Ketamin-Xylazin-Gemisches (150mg/kg Körpergewicht Ketamin + 20mg/kg Körpergewicht Xylazin; Ketanest®/Rompun®) tief narkotisiert. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und der linke Ventrikel kanüliert. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs wurden Blutproben entnommen und heparinisiert (0,25IU/ml). Durch Zentrifugation (10min, 650g) wurde Blutplasma gewonnen und bei -80°C gelagert. Die Tiere wurden anschließend entblutet und mit PBS/Heparin (0,01%) perfundiert. Die Niere und andere Organe wurden aus dem eröffneten Abdomen entnommen und in Flüssigstickstoff-gekühltem Isopentan schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C. Die Cholesterin- und Triglyceridlevel der Plasmaproben wurden spectrophotometrisch analysiert.

Der Tierversuchsantrag wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (V54-19c2015h01MR20/26 Nr.21/2014).

### 2.2.3 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Nieren wurden mittels TissueTek auf Trägern befestigt und im Kryotom eingespannt. Bei -21°C Objekttemperatur wurden 6-7µm dicke Schnitte angefertigt und auf Super Frost Objektträger aufgenommen. Die Objektträger wurden mittels eisgekühlten Acetons zehn Minuten bei -20°C fixiert und anschließend bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.4 Morphologie/Histologie

#### Azanfärbung nach Heidenhain, aus Romeis 1968

Die Azanfärbung gehört zu den Bindegewebsfärbungen. Neben Kernen und Zytoplasma, die sich rot anfärben, treten die blauen Kollagenfasern deutlich hervor. Neben der kontrastreichen Darstellung des kollagenen Bindegewebes hat sie sich auch für Drüsenfärbungen bewährt und zählt zu den besten und gebräuchlichsten Färbungen (Romeis 1968).

- |    |  |             |
|----|--|-------------|
| 1. | Fixierung in 4% PFA/PBS<br>Spülen in Aqua dest.  | 12min       |
| 2. | Färben in vorgewärmter Azokarmin-Lösung (0,1g Azokarmin G in 100ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und filtrieren) im Wärmeschränk, ca. 60°C<br>Spülen in Aqua dest. | ca. 30min   |
| 3. | Differenzieren in Anilinalkohol-Lösung (1ml Anilinöl auf 1000ml 90% Ethanol) bis die Kerne durch Entfärbung des übrigen Gewebes gut hervortreten                             |             |
| 4. | Eisessig-Alkohol (1ml Essigsäure auf 100ml 96% Alkohol) zur Unterbrechung der Differenzierung  |             |
| 5. | Beizung des Bindegewebes mit 5% Phosphorwolframsäure<br>Abspülen in Aqua dest.   | mind. 30min |
| 6. | Färben in Anilinblau-Tartrazin-Lösung (frisch filtriert)<br>Kurz in Aqua dest. spülen  | ca. 3-4min  |
| 7. | Entwässern in 96% Ethanol  |             |
| 8. | Spülen in 100% Isopropanol   | 2 x 10min   |

- |     |                               |          |
|-----|-------------------------------|----------|
| 9.  | Spülen in Xylol               | 3 x 5min |
| 10. | Eindecken mit Roti®Histo Kitt |          |

### Oil Red O – Färbung nach Lillie

Der rote Farbstoff Oil Red O (ORO) wird zur Darstellung von Triglyceriden verwendet. Aus einer Stammlösung, für welche 0,5g ORO-Farbstoff in 100ml Isopropanol im erwärmten Wasserbad gelöst werden, wird vor der Färbung jedes Mal frisch eine Arbeitslösung hergestellt (Lillie und Ashburn 1943).

- |    |  |       |
|----|--|-------|
| 1. | Fixierung in 4% PFA/PBS  | 10min |
|    | Spülen in Leitungswasser   |       |
| 2. | Wässern in 60% Isopropanol   |       |
| 3. | Färbung mit frisch angesetzter ORO Arbeitslösung   | 15min |
|    | Hierfür 30ml Stammlösung mit 20ml Aqua dest. mischen, 10min stehen lassen und filtern, sofort abdecken |       |
| 4. | Wässern in 60% Isopropanol   |       |
| 5. | Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun   | 8min  |
| 6. | Wässern in Aqua dest.  | 10min |
| 7. | Wässrig eindecken mit Immu-Mount und Deckglas  |       |

### 2.2.5 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Färbung soll ein bekanntes Antigen nachgewiesen und lokalisiert werden. Im Folgenden wurde die sog. indirekte Methode angewandt. Bei dieser wird der spezifisch gebundene Primärantikörper mittels eines markierten Sekundärantikörpers, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, nachgewiesen. Zur Detektion dienten Sekundärantikörper, die entweder mit dem Meerrettich-Peroxidase-Komplex (engl. Horseradish-Peroxidase-Complex, HRP) oder mit Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelt waren. Die endogene AP wurde mit Levamisol (0,15mg/dl) blockiert.



## MOMA-2 und F4/80

### 1. Tag

1. Aus -80°C auf Raumtemperatur (RT) bringen, Schnitte mit PAP-Stift umranden
2. Fixieren mit 4% PFA in PBS 5min
3. Waschen mit PBS 3 x 5min
4. Blocken mit 5 % Normal-Serum (Schwein) in PBS 30min
5. Waschen mit PBS 3 x 5min
6. Inkubation des Primärantikörpers in feuchter Kammer über Nacht, 4°C

### 2. Tag

1. Waschen mit PBS 3 x 5min
2. Inkubation des Sekundärantikörpers 1h bei RT
3. Waschen mit PBS 3 x 5min
4. Färbung mit Fast Red Färbelösung ca. 6min
5. Stoppen der Reaktion in Aqua dest.
6. Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun 5 - 10min
7. In Leitungswasser stoppen und bläuen 10min
8. Wässrig eindecken mit Immu-Mount und Deckglas

Primärantikörper	Verdünnung in PBS	Sekundärantikörper	Verdünnung in PBS
MOMA-2	1:50	Ziege anti-Ratte, AP-gekoppelt	1:200
F4/80	1:50	Ziege anti-Ratte, AP-gekoppelt	1:200

*Tabelle 3: Immunhistochemie MOMA-2 und F4/80, Sekundärantikörper und Verdünnungen*

Für die Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen und entsprechend in genau gleicher Weise verfahren. Als Positivkontrollen wurden Milzproben (kryofixiert, PFA-fixiert und Paraffin-eingebettet) und Dünndarmproben (PFA-fixiert und Paraffin-eingebettet) von Mäusen verwendet.

## TNF $\alpha$

### 1. Tag

1. Aus -80°C auf RT bringen, Schnitte mit PAP-Stift umranden
2. Fixieren mit 4% PFA in PBS 10min
3. Waschen mit PBS 3 x 5min
4. Blocken mit 5% Ziegen-Serum in PBS 30min
5. Waschen mit PBS 3 x 5min
6. Inkubation des Primärantikörpers in feuchter Kammer über Nacht, 4°C

### 2. Tag

1. Waschen mit PBS 3 x 5min
2. Inkubation des Sekundärantikörpers 1h bei RT
3. Waschen mit PBS 3 x 5min
4. Färbung mit DAB ca. 3min
5. Stoppen der Reaktion in PBS
6. Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun 5 - 10min
7. In Leitungswasser stoppen und bläuen 10min
8. Wässrig eindecken mit Immu-Mount oder Kaisers Glycerol  
Gelatine und Deckglas

Primärantikörper	Verdünnung in PBS	Sekundärantikörper	Verdünnung in PBS
TNF $\alpha$	1:100	Ziege anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:400

Tabelle 4: Immunhistochemie TNF $\alpha$ , Sekundärantikörper und Verdünnungen

Für die Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen und ansonsten in gleicher Weise verfahren. Als Positivkontrolle dienten kryofixierte Milzschnitte von Mäusen.

## IL-6

1. Aus -80°C auf RT bringen, Schnitte mit PAP-Stift umranden
2. Fixieren mit 4% PFA in PBS 10min
3. Waschen mit PBS 3 x 5min
4. Blocken mit 5 % Ziegen-Serum in PBS 3min
5. Waschen mit PBS 3 x 5min
6. Inkubation des Primärantikörpers 2h bei RT
7. Waschen mit PBS 3 x 5min
8. Inkubation des Sekundärantikörpers 1 h bei RT
9. Waschen mit PBS 3 x 5min
10. Färbung mit DAB ca. 3min
11. Stoppen der Reaktion in PBS
12. Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun 5 - 10min
13. In Leitungswasser stoppen und bläuen 10min
14. Wässrig eindecken mit Immu-Mount oder Kaisers Glycerol  
Gelatine und Deckglas

Primärantikörper	Verdünnung in PBS	Sekundärantikörper	Verdünnung in PBS
IL-6	1:600	Ziege anti-Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:200

Tabelle 5: Immunhistochemie IL-6, Sekundärantikörper und Verdünnungen

Für die Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen und ansonsten in gleicher Weise verfahren. Als Positivkontrolle dienten kryofixierte Milzschnitte von Mäusen.

### 2.2.6 Auswertung

#### Morphologie

Zur Untersuchung der Morphologie und deren Veränderungen in den unterschiedlichen Tiergruppen wurde die Azanfärbung herangezogen.

Die Lage der Aa. arcuatae markiert die Mark-Rinden-Grenze der Niere. Das Erkennen dieser Gefäßstrukturen war jedoch oft nicht ausreichend eindeutig möglich. In den meisten Schnitten war es daher zielführend, die Grenze anhand von Übersichtsbildern in 25facher Vergrößerung mithilfe der folgenden Kriterien zu bestimmen: Zum einen wurde die Lage der Aa. arcuatae, die eindeutig erkennbar war, herangezogen. Weitere Kriterien zur Bestimmung der Mark-Rinden-Grenze waren die „nierenkapselfernste“ bzw. „marknächste“ Lage der Glomeruli sowie der Übergang der Konvolute in die geraden Tubulusabschnitte (Abbildung 11).

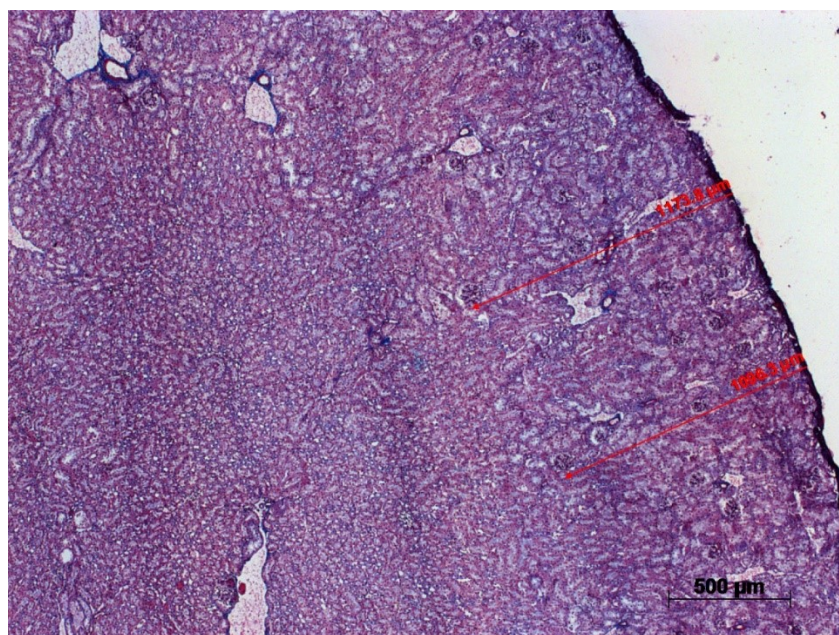


Abbildung 11: Vermessung des Nierenkortexes, Azanfärbung nach Heidenhain; CED PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH742, 25x

Es wurde an jeweils drei Stellen pro Tier die Breite des Kortexes vermessen und daraus der Mittelwert berechnet. Es ergab sich nach Vermessung und Berechnung ein durchschnittlicher Kortexbereich von 1100,69µm (Standardfehler 35,54µm). Dieser definierte Referenzbereich diente zur Anfertigung der nachfolgend erläuterten Fotos, welche zur Auswertung der Morphologie herangezogen wurden.

Zur Quantifizierung der Glomeruli wurden pro Tier (Gesamtzahl 55) jeweils 5 Bilder in 100facher Vergrößerung innerhalb des definierten Zielbereiches der Cortices angefertigt. Hier wurden alle angeschnittenen Glomeruli mithilfe des Programmes ImageJ gezählt.

Des Weiteren wurden pro Tier mindestens 5 Bilder von Glomeruli, bei denen sowohl Harn- als auch Gefäßpol angeschnitten waren in 200facher Vergrößerung angefertigt. Es wurden die Flächen von mindestens fünf der fotografierten Glomeruli sowie deren Durchmesser von Harn- zu Gefäßpol vermessen und die Mittelwerte errechnet.

Zur Beurteilung einer möglichen Fibrosierung des Nierenkortexes wurden die Bilder der Azanfärbung in 100facher Vergrößerung mit dem Colour Deconvolution Tool von ImageJ gemessen und ausgewertet (Abbildung 12). Alle hier blau angefärbten bindegewebigen Strukturen wurden anteilig an der Fläche des Bildausschnittes bestimmt, abzüglich des weißen Bildhintergrundes. Dies ist nachfolgend anhand von Beispielbildern gezeigt (NF PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier T145):

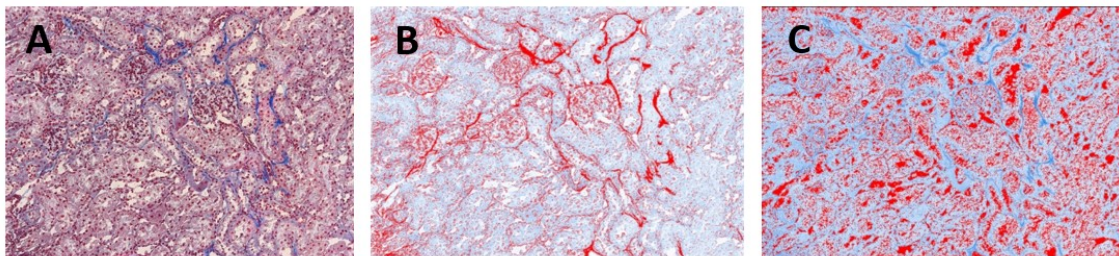


Abbildung 12: Methodik Bestimmung Bindegewebsanteil im Nierenkortex, A: Ausgangsbild, Azanfärbung, 100x, B: Anteil Bindegewebsstrukturen in Rot (hier 14,5%), C: Anteil Lücken/weißer Bildhintergrund in Rot (hier 23,4%)

Die Berechnung des Bindegewebsanteils erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Relativer Anteil Bindegewebe \%} = (\text{Anteil Bindegewebe \%} \times 100) / (100 - \text{Hintergrund \%})$$

### Immunhistochemie

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen MOMA-2 (Monozyten-Makrophagen-Antikörper-2) und F4/80 wurden pro Tier 5 Bilder im Referenzbereich in 100facher Vergrößerung angefertigt. Alle in diesem Bereich positiv angefärbten Zellen, die durch einen zugehörigen angeschnittenen Zellkern eindeutig als solche identifiziert werden konnten, wurden gezählt.

Zur Auswertung der TNF $\alpha$  und der IL-6 Färbungen wurden pro Tier 18 Bilder (3 mal 2 nebeneinanderliegende Bildausschnitte pro Nierenschnitt) in 400facher Vergrößerung angefertigt. Beim Auszählen der positiv gefärbten Zellen mit eindeutig identifizierbarem Zellkern wurde zusätzlich die Lokalisation ausgewertet (Abbildung 13). Es wurde eine



Einteilung in glomeruläre und extraglomeruläre Zellen getroffen. Die extraglomerulären Zellen wurden zudem weiter in tubulär, vaskulär und in interstitiell/im Bindegewebe gelegene Zellen untergliedert. Die Auszählung erfolgte mit ImageJ.

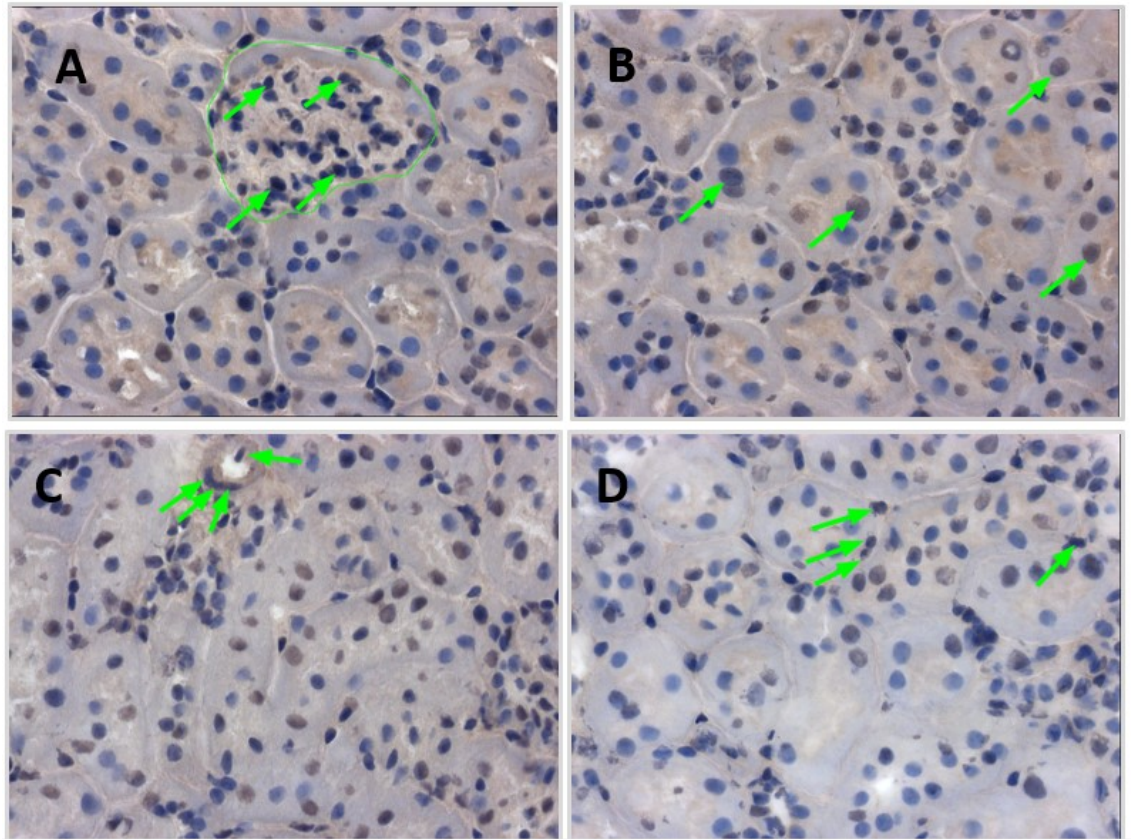


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit IL-6-positiven Zellen (Pfeile). Nach Lokalisationen: A: glomerulär, B: tubulär, C: vaskulär, D: interstitiell; PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH555, 400x

### Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (=Standardfehler des Mittelwerts, SEM) präsentiert. Die n-Werte geben die Anzahl der ausgewerteten Tiere an.

Mittelwerte und Standardfehler wurden mit Microsoft Excel 2016 berechnet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SigmaPlot 12.0, die grafische Darstellung der Daten und Ergebnisse mit Microsoft Excel 2016.

### Zweigruppenvergleiche:

Zweigruppenvergleiche wurden zwischen den CED gefütterten ApoE<sup>-/-</sup> und WT Mäusen angestellt. Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Bei

parametrischen Daten wurde die statistische Signifikanz bei den Zweigruppenvergleichen mit dem T-Test für unverbundene Stichproben gemessen. Bei nicht parametrischen Datenverteilungen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant eingestuft.

Mehrgruppenvergleiche/Varianzanalysen:

Zum Vergleich der DKO (PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) und mit dem Einfach-KO (ApoE<sup>-/-</sup>) unter Einbeziehung des Faktors der Fütterung (NF oder CED) wurden Two-Way-ANOVA-Tests (Analysis of Variance) durchgeführt. Wenn sich hier signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben, wurde der Holm-Sidak Test durchgeführt, um diejenigen Gruppen zu isolieren, die sich von den anderen unterschieden. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant eingestuft.

Hierzu habe ich eine kostenlose statistische Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg in Anspruch genommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gewicht, Plasma-Cholesterin- und Plasma-Triglyceridspiegel

##### 3.1.1 Gewicht

Die Daten des Gewichts und der Blutlipide wurden von der Arbeitsgruppe (AG) Kinscherf im Institut für Anatomie und Zellbiologie erhoben. Sie sind noch nicht publiziert und sollen mit den in der vorliegenden Dissertation erhobenen Daten im Zusammenhang dargestellt werden.

Das Gewicht der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen CED (Mittelwert 33g) war signifikant (\*p=0,0252) um 11% niedriger als das der WT Mäuse nach 20 Wochen CED (37g) (Abbildung 14).

Die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse waren nach 20 Wochen CED signifikant (\*\*\*p<0,001) um 31% schwerer als PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unter NF (Abbildung 14).

Nach 20 Wochen CED waren die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant (\*p=0,033) um 15% schwerer als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Unter NF waren die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse allerdings signifikant (\*p=0,038) um 15% leichter als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Abbildung 14).

Die statistische Untersuchung zeigt, dass eine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen den Einflussfaktoren Futter und ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Gendefizit in Bezug auf das Tiergewicht besteht (\*p=0,004). Der Effekt des einen Einflussfaktors hängt vom Vorhandensein des anderen ab.



## Ergebnisse

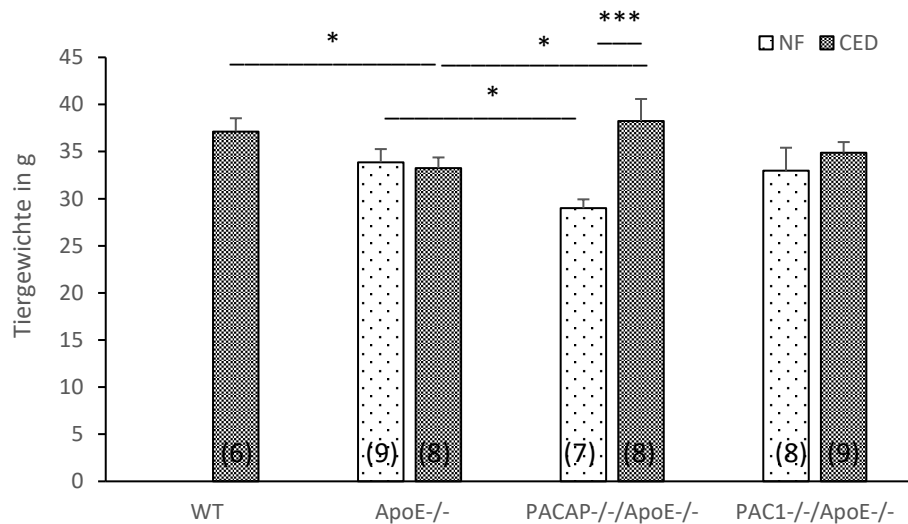


Abbildung 14: Tiergewichte (in g) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \*p<0,05, \*\*\*p<0,001

### 3.1.2 Plasma-Cholesterinspiegel

Nach CED war der Plasma-Cholesterinspiegel bei den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant (\*\*p=0,001) 9-mal höher als bei den WT Mäusen (Abbildung 15).

Innerhalb aller KO-Genotypen war der Plasma-Cholesterinspiegel bei den Mäusen nach 20 Wochen CED höher als bei den Mäusen unter NF. Nach 20 Wochen CED war er bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant (\*\*p<0,001) um 95% höher, bei den PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant (\*p=0,014) um 78% und bei den PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant (\*p=0,029) um 40% höher als bei den entsprechenden Genotypen unter NF (Abbildung 15).

## Ergebnisse

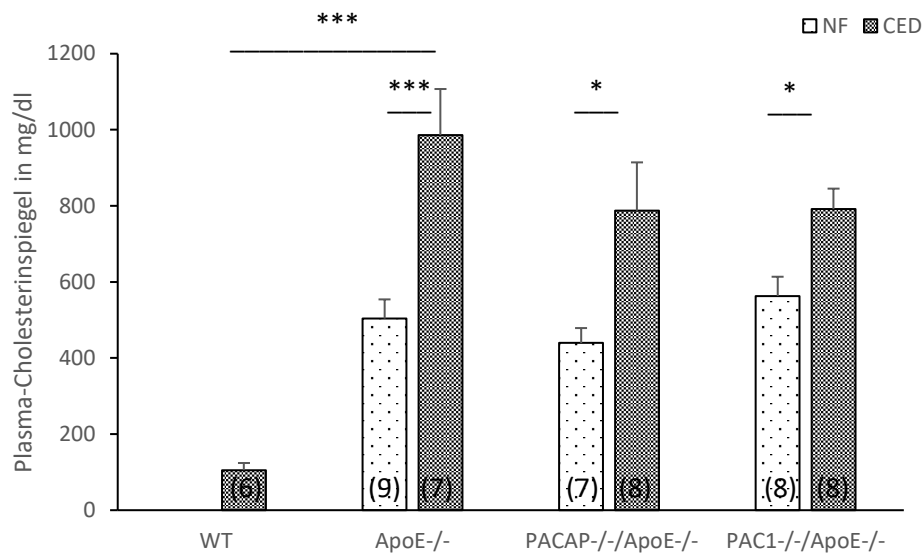


Abbildung 15: Plasma-Cholesterinspiegel (in mg/dl) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

### 3.1.3 Plasma-Triglyceridspiegel

In PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen war der Plasma-Triglyceridspiegel nach 20 Wochen CED signifikant (\* $p = 0,032$ ) um 54% höher als in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen CED (Abbildung 16). In Abbildung 17 sind exemplarisch Lipidansammlungen in den Glomeruli beider Fütterungsregime gezeigt.

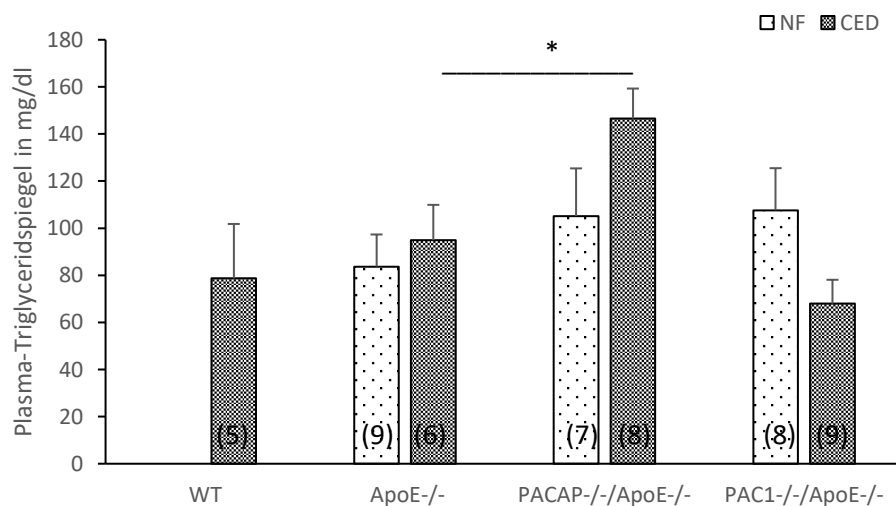


Abbildung 16: Plasma-Triglyceridspiegel (in mg/dl) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \* $p < 0,05$

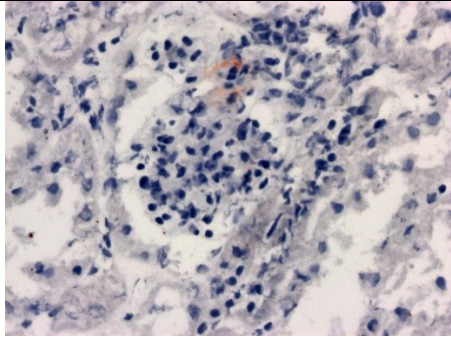
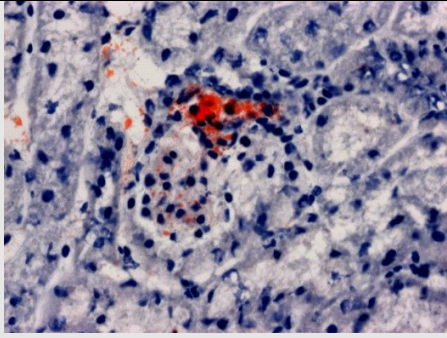
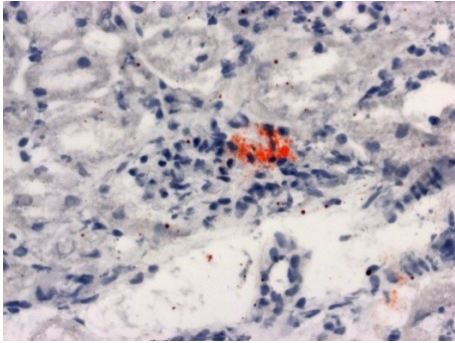
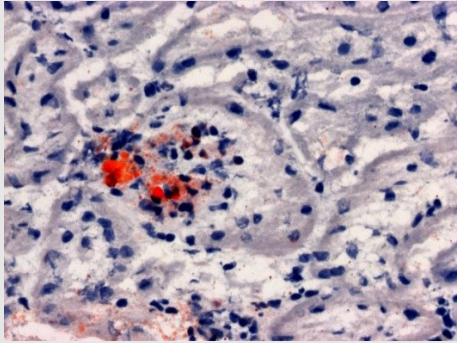
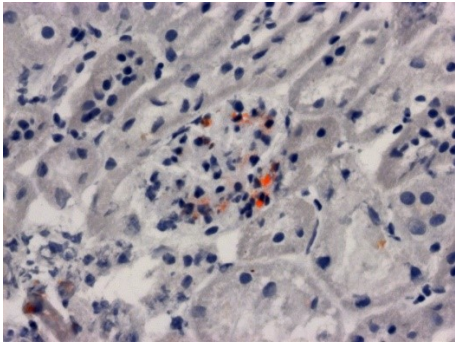
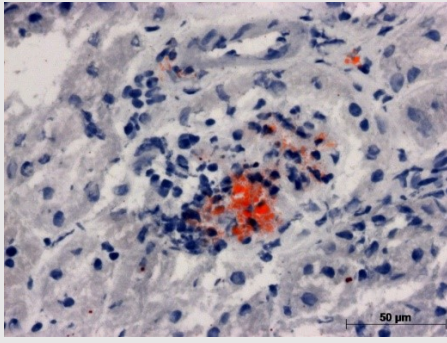
Genotyp	NF	CED
ApoE <sup>-/-</sup>		
PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>		
PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>		

Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von Blutlipiden (mittels ORO Färbung) in Glomeruli unterschiedlicher Genotypen

## 3.2 Morphologie des Nierenkortexes

Um die Morphologie der Niere zu untersuchen, wurde die Anzahl der Nierenkörperchen pro  $\text{mm}^2$  bestimmt, deren Fläche und Durchmesser vermessen und der Anteil an Bindegewebe im Nierenkortex in % berechnet.

### 3.2.1 Anzahl der Nierenkörperchen

Um zu untersuchen, ob sich ApoE-, PACAP- und PAC1-Defizienz und/oder CED auf die Anzahl der Nierenkörperchen im Kortex auswirkt, wurden diese ausgezählt (Glomeruli/ $\text{mm}^2$ ) (Abbildung 18).

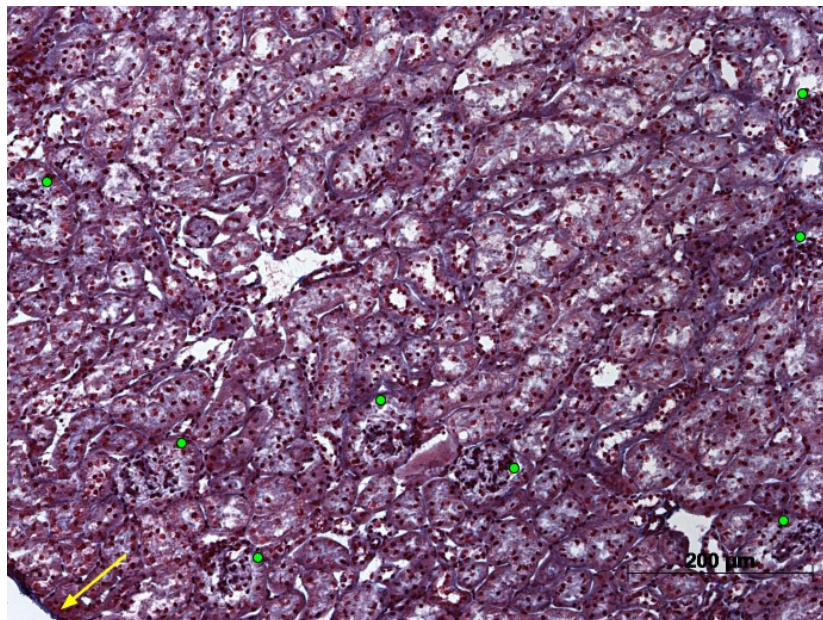


Abbildung 18: Exemplarischer Nierenquerschnitt zur Darstellung der Quantifizierung der Nierenkörperchen (grüne Punkte), gelber Pfeil zeigt auf die Nierenkapsel, Tier FzH555, 100x, Azanfärbung nach Heidenhain, CED ApoE<sup>-/-</sup>/PACAP<sup>-/-</sup>, Tier FzH55

Bei den PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen CED war die Dichte der Nierenkörperchen signifikant (\*p=0,022) um 24% höher als in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen unter CED (Abbildung 19).



## Ergebnisse

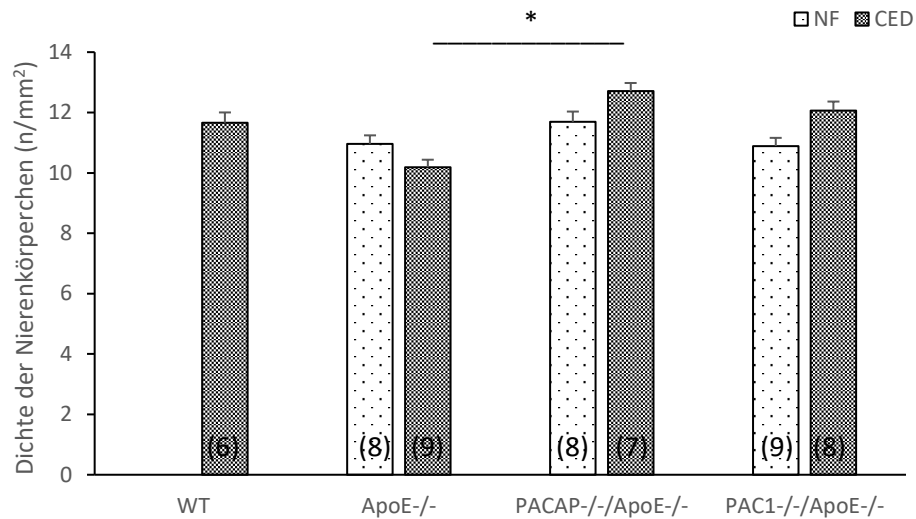


Abbildung 19: Dichte der Nierenkörperchen (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \*p<0,05

### 3.2.2 Fläche der Nierenkörperchen

Um zu untersuchen, ob und inwiefern sich eine ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup> Defizienz und/oder CED auf die Fläche der Nierenkörperchen auswirkt, wurde diese vermessen (Abbildung 20).

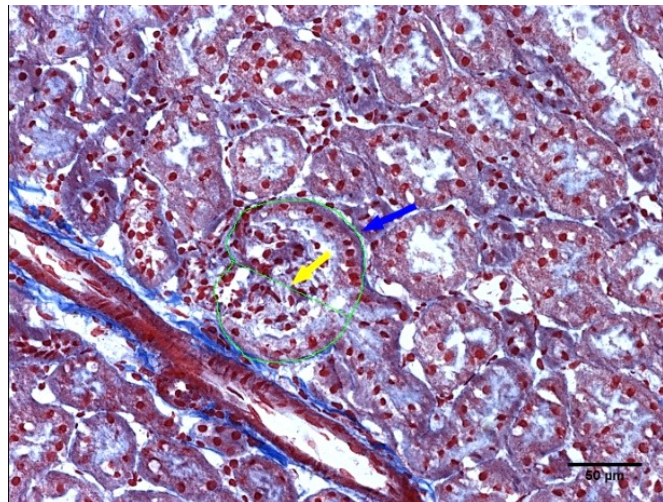


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung der Vermessung eines Nierenkörperchens, 200x Vergrößerung, Azanfärbung, blauer Pfeil zeigt auf Umriss des Nierenkörperchens, gelber Pfeil zeigt auf Durchmesser von Harn- zu Gefäßpol; CED ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH544

Nach 20 Wochen CED waren die Nierenkörperchen der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant (\*p=0,0413) um 21% größer als die Nierenkörperchen der WT Mäuse (Abbildung 21).

Die Nierenkörperchen der PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unter CED waren signifikant (\*\*p=0,007) um 22% kleiner als die der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unter CED (Abbildung 21).

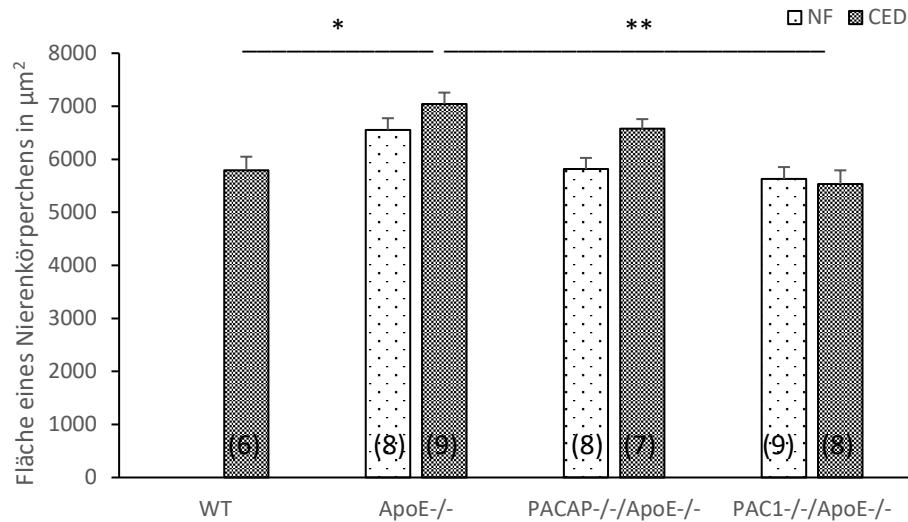


Abbildung 21: Fläche eines Nierenkörperchens (in µm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \*p<0,05, \*\*p<0,01

### 3.2.3 Durchmesser der Nierenkörperchen

Die Nierenkörperchen wurden von Gefäß- zu Harnpol vermessen (Abbildung 20) um einen Einfluss der PACAP- bzw. PAC1- Defizienz bzw. der beiden Fütterungsregime zu detektieren.

PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten sowohl nach NF, als auch nach 20 Wochen CED signifikant (NF \*p=0,027, CED \*p=0,036) um 10% kleinere Durchmesser der Nierenkörperchen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Abbildung 22).

## Ergebnisse

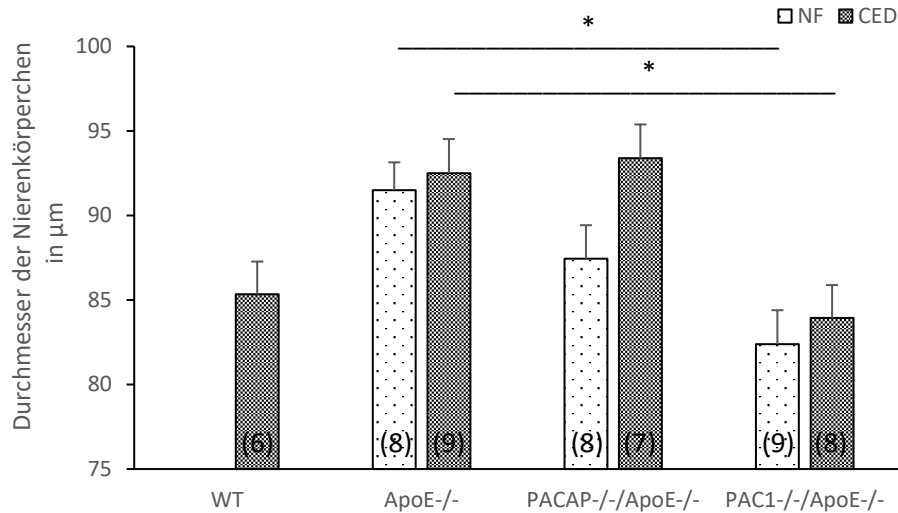


Abbildung 22: Durchmesser der Nierenkörperchen (in  $\mu\text{m}$ ) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere; Signifikanz: \* $p < 0,05$

### 3.2.4 Relativer Anteil Bindegewebe im Nierenkortex

Um zu untersuchen, ob bei ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>, oder PAC1-Defizienz und/oder cholesterinreiche Fütterung ein Einfluss auf eine Fibrosierung des Nierenkortexes nachzuweisen ist, wurde der Bindegewebsanteil untersucht (Abbildung 12). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Bindegewebsanteil des Nierenkortexes durch die beiden verschiedene Fütterungsregime oder durch die ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup> bzw. PAC1-Defizienz (Abbildung 23).

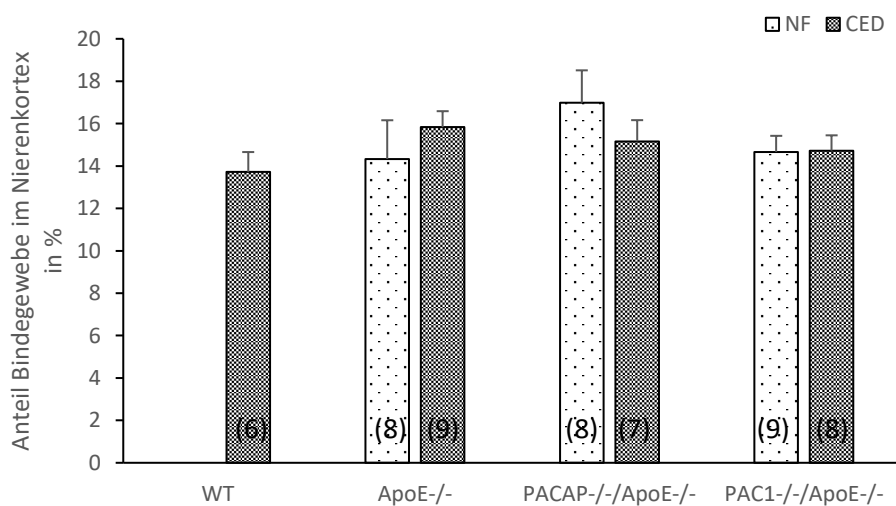


Abbildung 23: Anteil an Bindegewebe im Nierenkortex (in %) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 MOMA-2

MOMA-2 immunreaktive Monozyten bzw. Makrophagen waren vornehmlich im Interstitium und im Bereich um die Gefäße herum, aber auch in Nierenkörperchen lokalisiert (Abbildung 24, Abbildung 25).

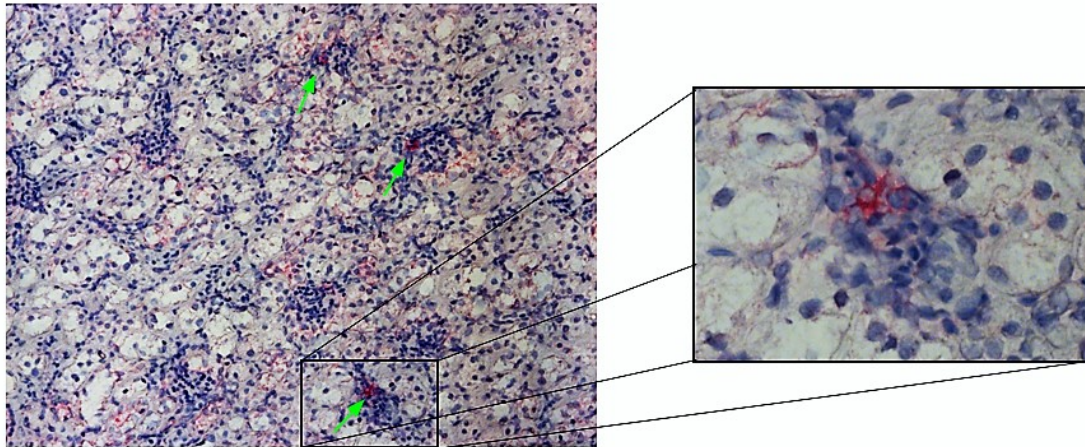


Abbildung 24: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: MOMA-2-positive Zellen (Pfeile); CED PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH741, 100x

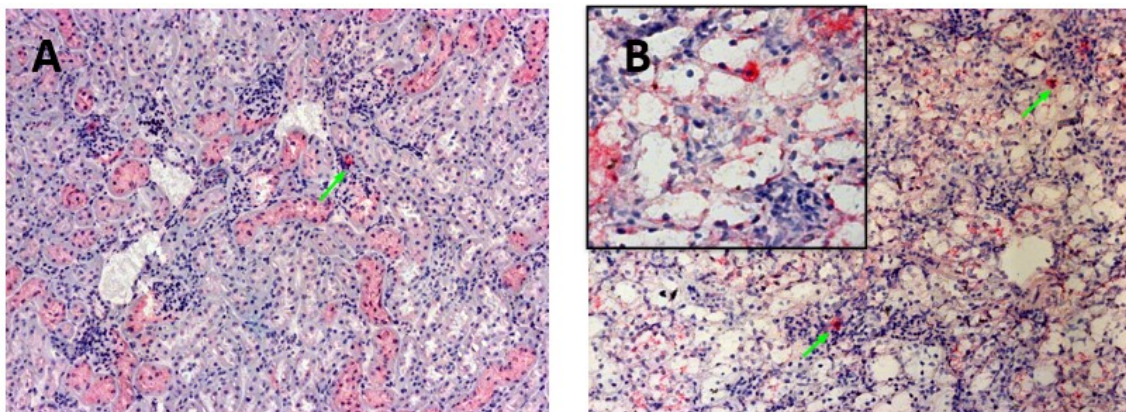


Abbildung 25: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: MOMA-2-positive Zellen (Pfeile), A: CED WT, Tier T545, 100x; B: CED ApoE<sup>-/-</sup>, Tier M430, 100x

Die Zahl der MOMA-2<sup>+</sup> (MOMA-2-positiven) Zellen war bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen CED signifikant (\*p=0,0201) um 101% höher (doppelt so hoch) als bei WT Mäusen nach 20 Wochen CED (Abbildung 25, Abbildung 26).



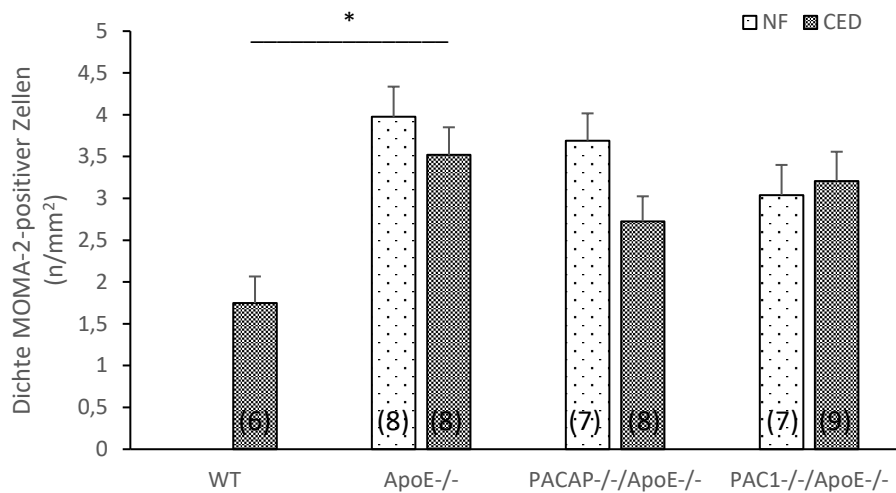


Abbildung 26: Dichte MOMA-2-positiver Zellen (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere, Signifikanz: \*p<0,05

## 3.3.2 F4/80

F4/80<sup>+</sup> (F4/80-positive) Makrophagen waren vor allem im Interstitium und im Tubulussystem lokalisiert (Abbildung 27, Abbildung 28).

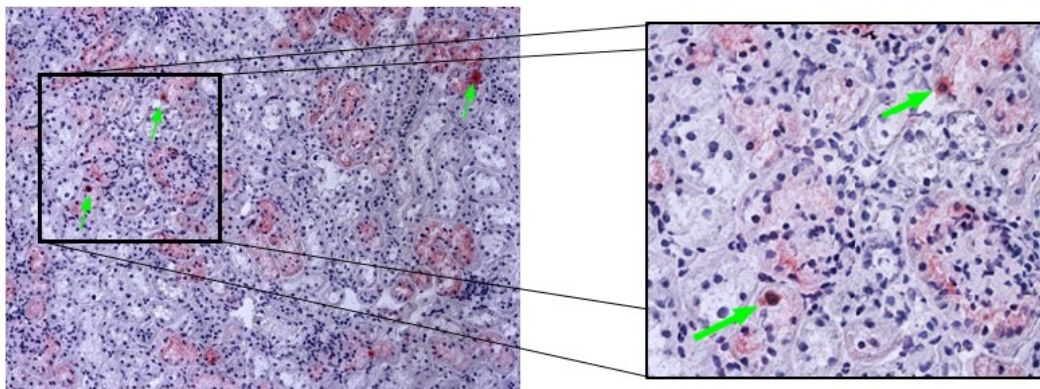


Abbildung 27: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: F4/80-positive Makrophagen (Pfeile); CED ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH543, 100x

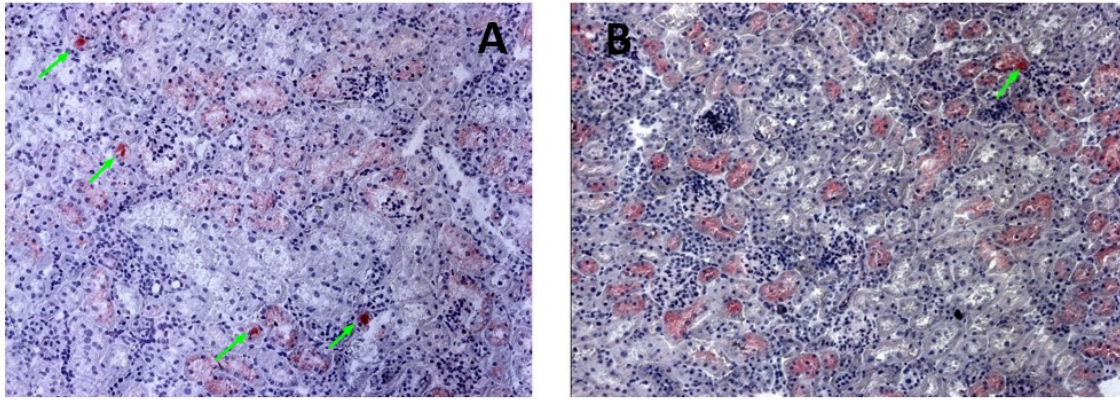


Abbildung 28: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes: F4/80-positive Makrophagen (Pfeile); A: CED ApoE<sup>-/-</sup>, Tier FzH542, 100x; B: CED PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, Tier T472, 100x

Bei der ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Fütterungstypen: ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen nach 20 Wochen CED eine signifikant (\*p=0,013) 2,5-fach höhere Dichte an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen auf als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unter NF (Abbildung 29).

PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 20 Wochen CED eine signifikant (\*\*p=0,002) 4fach geringere Dichte an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen CED (Abbildung 28, Abbildung 29).

Die statistische Untersuchung zeigt, dass eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Einflussfaktoren Futter und ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Gendefizit in Bezug auf die Anzahl F4/80<sup>+</sup> Makrophagen besteht (\*p=0,0031).

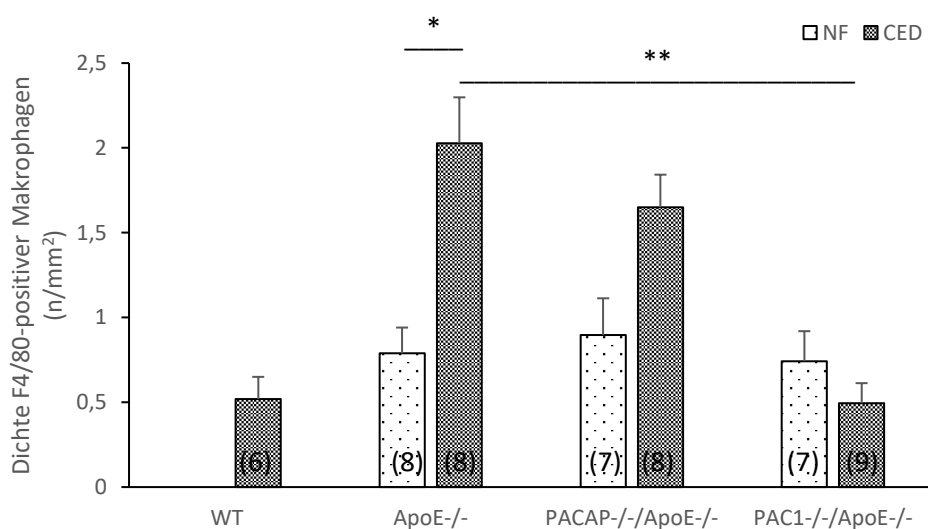


Abbildung 29: Dichte F4/80-positiver Makrophagen (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere, Signifikanz: \*p<0,05, \*\*p<0,001

### 3.3.3 IL-6

Bei NF und CED waren die meisten IL-6<sup>+</sup> (IL-6-positiven) Zellen im Tubulussystem lokalisiert, wobei dieses auf den ausgewerteten Bildern auch flächenmäßig den größten Anteil ausmachte. In Abbildung 30 ist die Verteilung der IL-6<sup>+</sup> Zellen nach Lokalisationen dargestellt (siehe hierzu auch Abbildung 13).

Bei ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen waren unter NF 6,6-fach, und unter CED 7,5-fach mehr IL-6<sup>+</sup> Zellen tubulär als glomerulär lokalisiert (Abbildung 30). Glomerulär zeigten sich unter NF und CED 4,2- bzw. 4,4-fach mehr IL-6<sup>+</sup> Zellen als interstitiell (Abbildung 30). Im Interstitium waren bei ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen unter NF 1,9-fach, unter CED 2,8-fach mehr IL-6<sup>+</sup> Zellen lokalisiert als vaskulär (Abbildung 30).

Unter CED zeigten sich in ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen a) tubulär 25% und b) glomerulär 42% mehr IL-6<sup>+</sup> Zellen als unter NF (Abbildung 30).

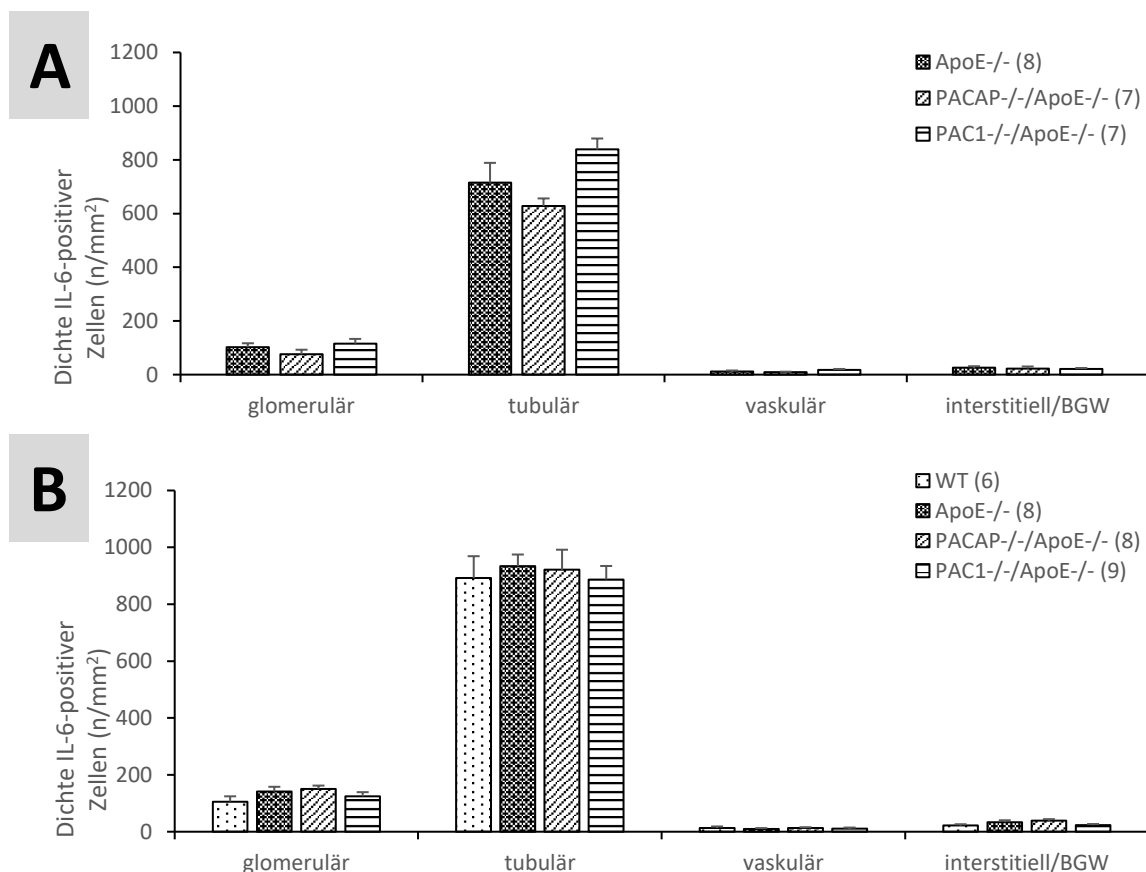


Abbildung 30: Dichte IL-6-positiver Zellen (n/mm<sup>2</sup>) der ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach deren Lokalisation im Nierenkortex; A: nach 20 Wochen NF, B: nach 20 Wochen CED, Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere



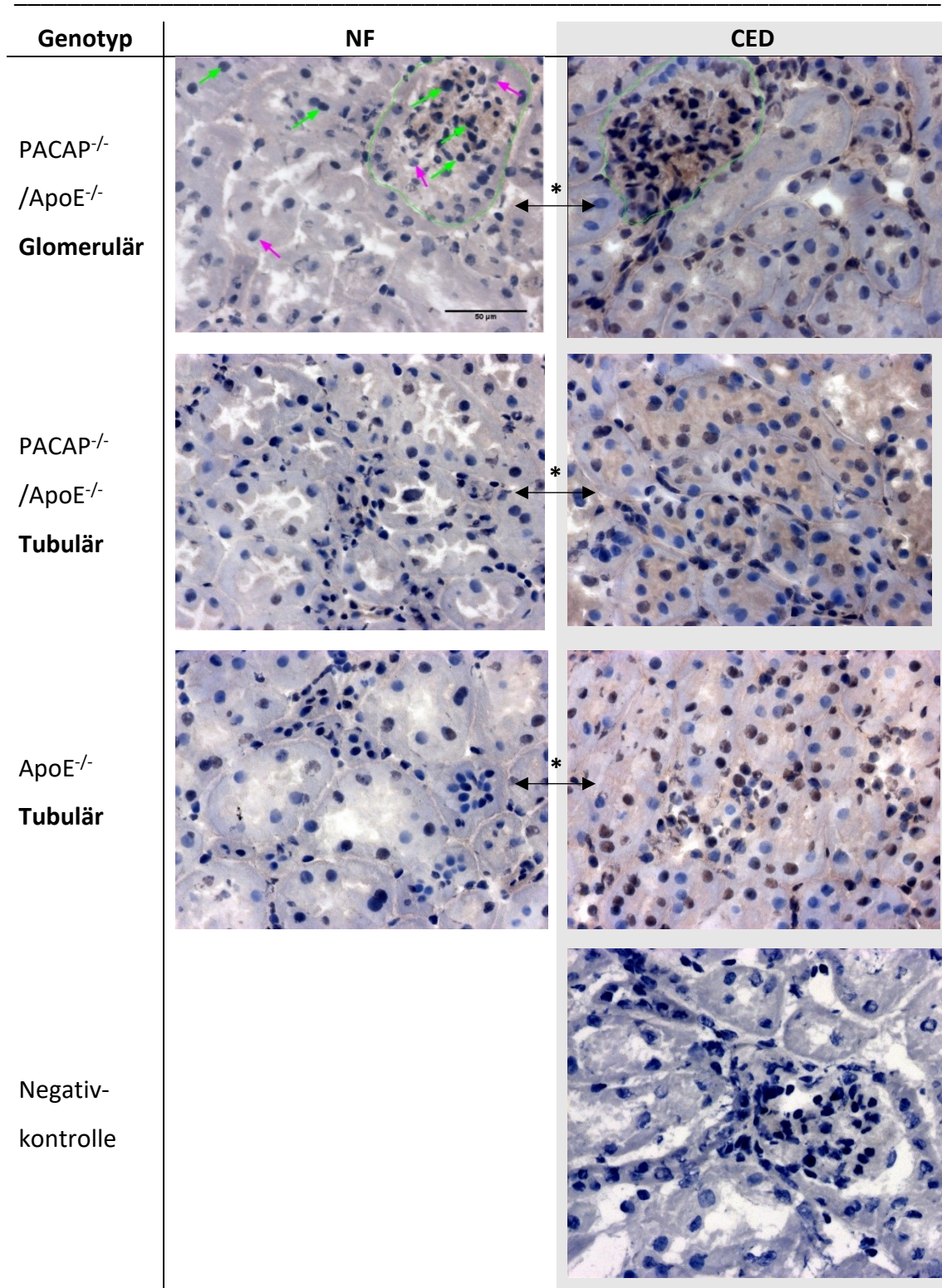


Abbildung 31: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit IL-6-positiven Zellen. Beispielhaft im Bild oben links (PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, NF): grüne Pfeile zeigen IL-6-positive Zellen, magentafarbene Pfeile zeigen IL-6-negative Zellen, alle Bilder 400x, Negativkontrolle=Färbung ohne Primärantikörper

Es folgt eine detailliertere Darstellung der Auswertung der im Glomerulus und im Tubulussystem gelegenen IL-6<sup>+</sup> Zellen, da sich in diesen Lokalisationen signifikante Unterschiede zwischen den Futtergruppen zeigten (Abbildung 32, Abbildung 33).

## Ergebnisse

Bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten sich nach 20 Wochen CED signifikant (\*\*p=0,002) um 99,5% mehr (annähernd doppelt so viele) glomerulär gelegene IL-6<sup>+</sup> Zellen als bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen NF (Abbildung 31, Abbildung 32).

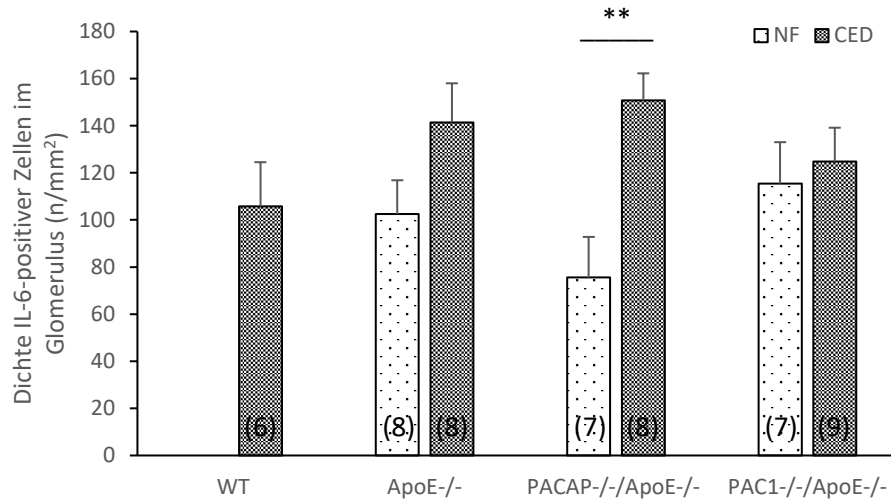


Abbildung 32: Dichte IL-6-positiver Zellen in den Glomeruli (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere, Signifikanz: \*\*p<0,01

ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 20 Wochen CED signifikant (\*p=0,019) um 30% mehr tubulär lokalisierte IL-6<sup>+</sup> Zellen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF (Abbildung 31, Abbildung 33).

PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 20 Wochen CED signifikant (\*\*p<0,001) um 46% mehr tubulär lokalisierte IL-6<sup>+</sup> Zellen als PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF (Abbildung 31, Abbildung 33).

## Ergebnisse

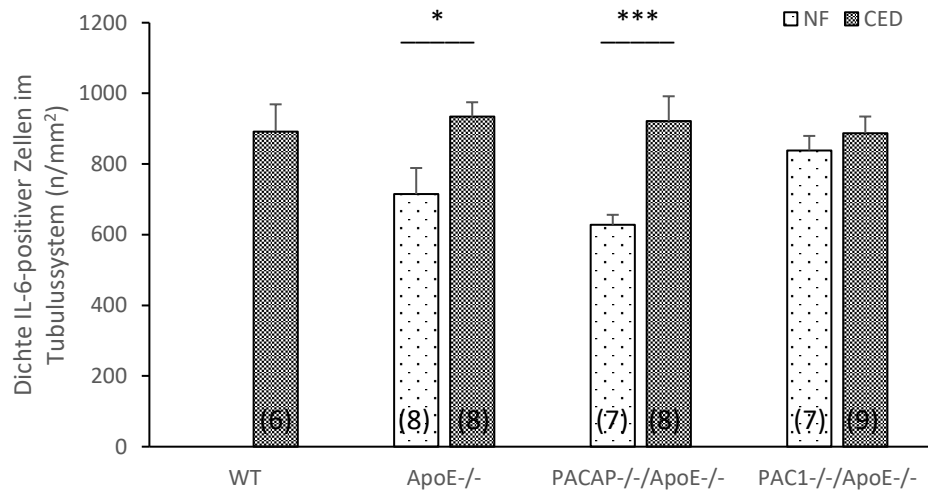


Abbildung 33: Dichte IL-6-positiver Zellen im Tubulussystem (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere, Signifikanz: \*p<0,05, \*\*\*p≤0,001

### 3.3.4 TNF $\alpha$

Bei NF und CED zeigten sich die meisten TNF $\alpha$ <sup>+</sup> (TNF $\alpha$ -positiven) Zellen im Tubulussystem, wobei dieses auf den ausgewerteten Bildern auch flächenmäßig den größten Anteil ausmachte. In Abbildung 34 ist die quantitative Verteilung der TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen nach Lokalisationen dargestellt.

Bei ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen waren unter NF 6-fach, und unter CED 5,5-fach mehr TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen tubulär als glomerulär lokalisiert (Abbildung 34). Glomerulär zeigten sich unter NF bzw. CED 3,6 - bzw. 5,2-fach mehr TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als vaskulär (Abbildung 34). In Blutgefäßen zeigten sich unter NF 1,5-fach, und unter CED 1,2-fach mehr TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als interstitiell (Abbildung 34).

Unter CED zeigten sich bei ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen tubulär 11% weniger TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als unter NF, glomerulär waren es etwa gleich viele (Abbildung 34). Vaskulär zeigten sich bei ApoE<sup>-/-</sup> bzw. DKO Mäusen unter NF 44% mehr TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als unter CED (Abbildung 34).

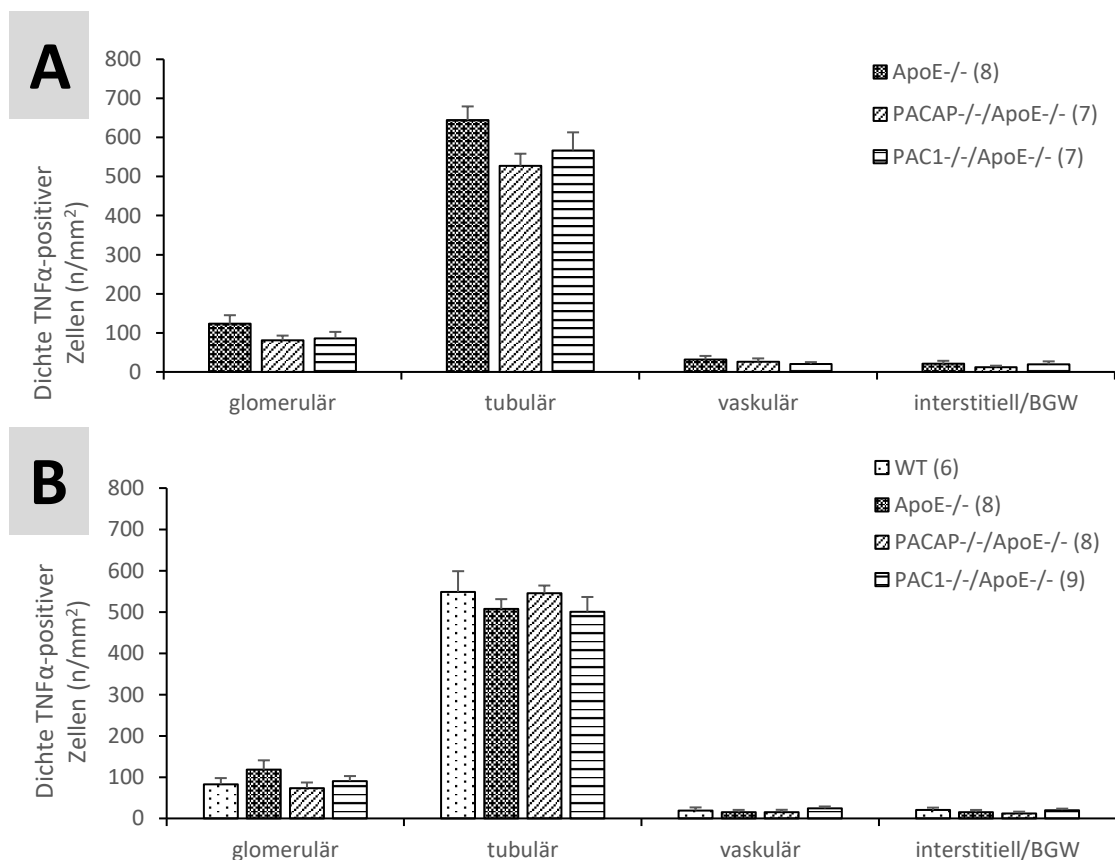


Abbildung 34: Dichte TNF $\alpha$ -positiver Zellen (n/mm<sup>2</sup>) der ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach deren Lokalisation im Nierenkortex; A: nach 20 Wochen NF, B: nach 20 Wochen CED, Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere

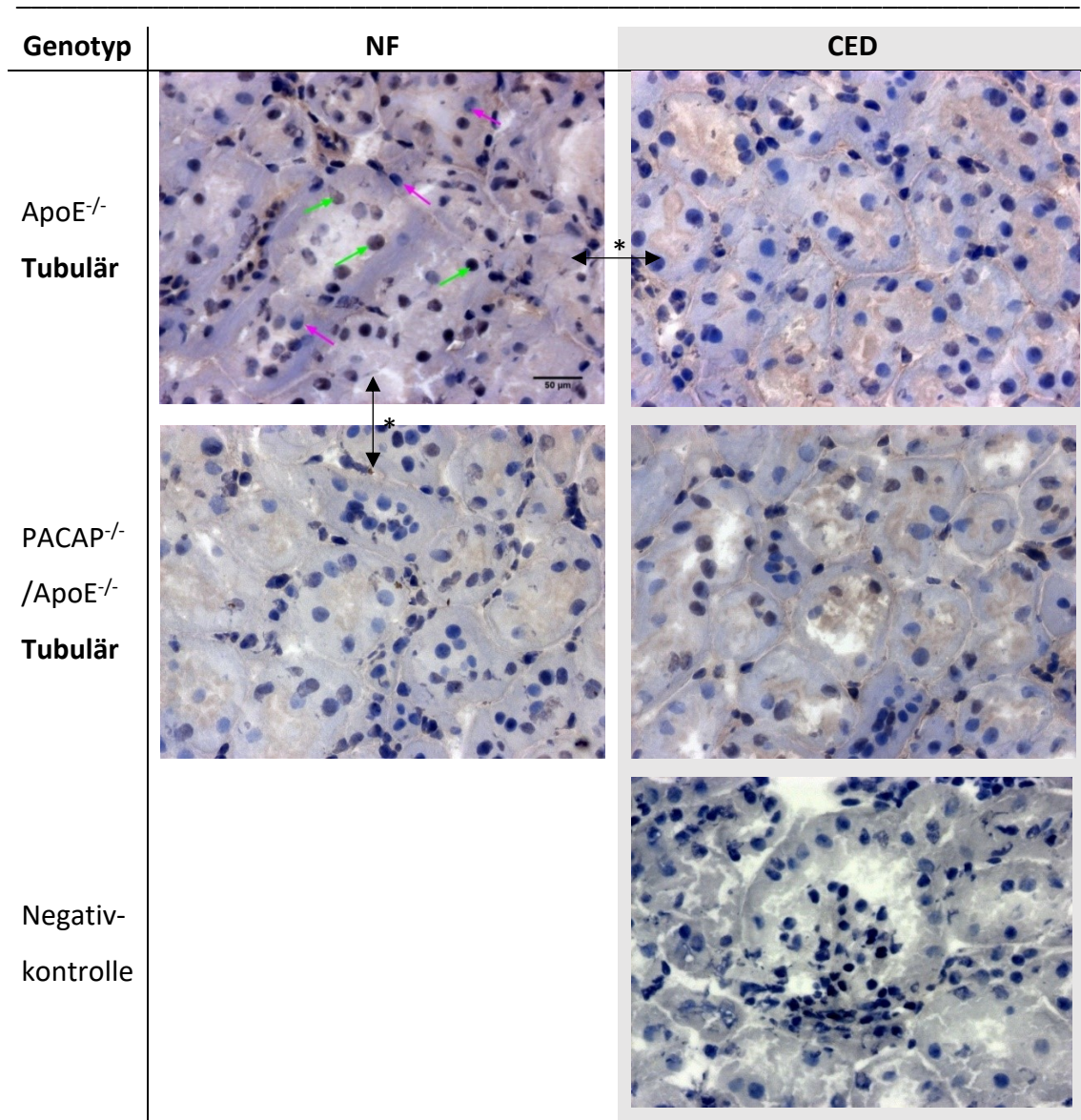


Abbildung 35: Exemplarische Fotos einer immunhistochemischen Färbung des Nierenkortexes mit TNF $\alpha$ -positiven Zellen. Beispielhaft im Bild oben links (ApoE<sup>-/-</sup> NF): grüne Pfeile zeigen TNF $\alpha$ -positive Zellen, magentafarbene Pfeile zeigen TNF $\alpha$ -negative Zellen, alle Bilder 400x, Negativkontrolle=Färbung ohne Primärantikörper

Es folgt eine detailliertere Darstellung der Auswertung der im Tubulussystem gelegenen TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen, da sich in dieser Lokalisation bei der statistischen Untersuchung signifikante Unterschiede zwischen und innerhalb der Genotypen ApoE<sup>-/-</sup> und PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> ergaben.

ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 20 Wochen CED signifikant (\*\*p=0,001) um 22% weniger tubulär lokalisierte TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unter NF (Abbildung 35, Abbildung 36).

Unter NF zeigten PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant (\*\*p=0,007) 19% weniger tubulär lokalisierte TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Abbildung 35, Abbildung 36).



## Ergebnisse

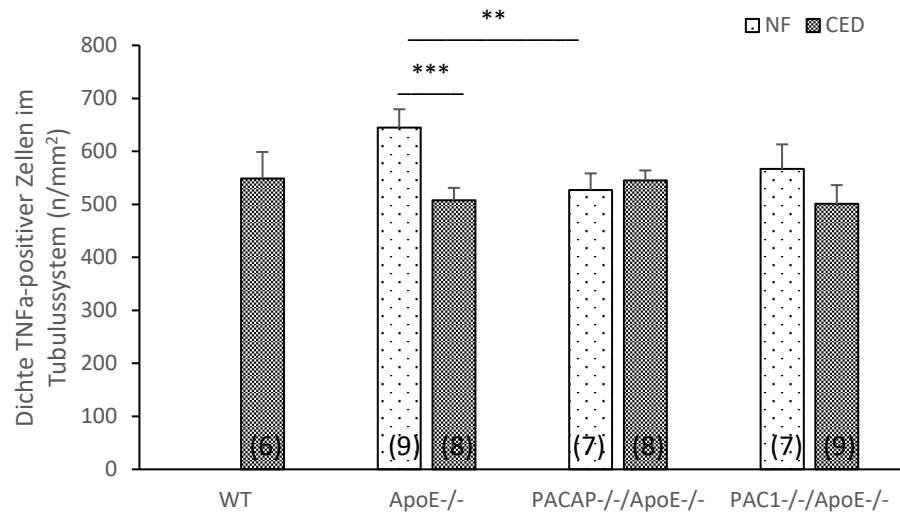


Abbildung 36: Dichte TNF $\alpha$ -positiver Zellen im Tubulussystem (n/mm<sup>2</sup>) der WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach 20 Wochen NF bzw. CED; Mittelwerte + Standardfehler, (n)=Anzahl der Tiere, Signifikanz: \*\*p<0,01, \*\*\*p≤0,001

### 3.3.5 Korrelation zwischen der Dichte IL-6- und TNF $\alpha$ -positiver Zellen

Weder NF noch CED bedingt eine Korrelation zwischen der Dichte IL-6<sup>+</sup> Zellen und der Dichte TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen (Tabellen im Anhang). Bei Untersuchung der Genotypen unter CED zeigten sich jedoch signifikant positive Korrelationen zwischen der Dichte IL-6<sup>+</sup> Zellen und der Dichte TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen bzgl. zweier Nierenkompartimente:

Bei den PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach CED korrelierte die Dichte vaskulär lokalisierter IL-6<sup>+</sup> und TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen signifikant (\*p<0,0117) positiv miteinander (Abbildung 37).

Bei den PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach CED korrelierte die Dichte interstitiell lokalisierter IL-6<sup>+</sup> und TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen signifikant (\*p<0,0314) positiv miteinander (Abbildung 37).

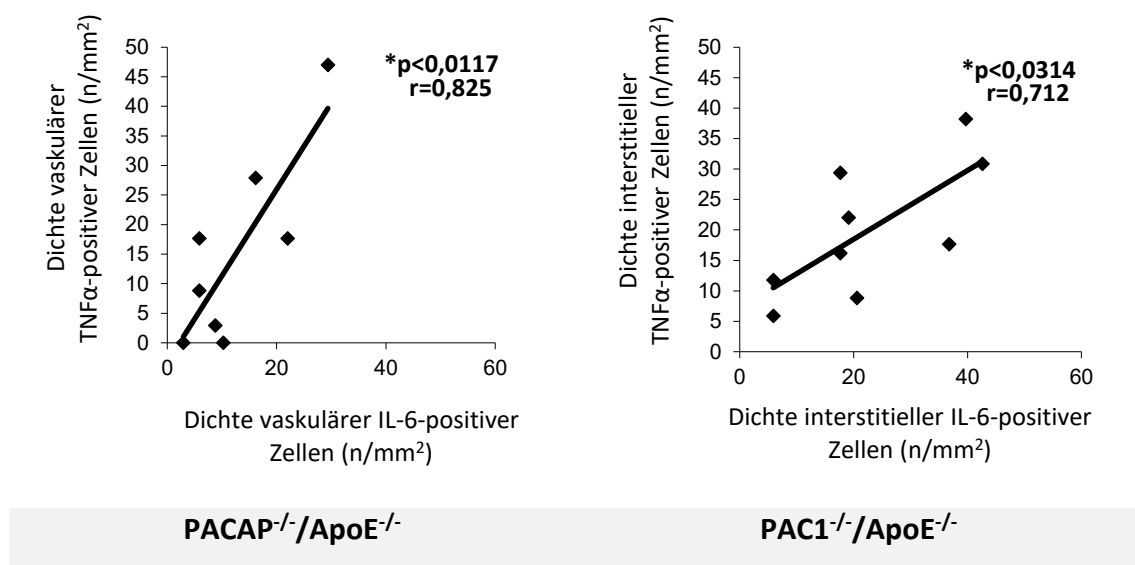


Abbildung 37: Korrelation der Dichte IL-6-positiver bzw. TNF $\alpha$ -positiver Zellen bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen (vaskuläre Lokalisation, n=8) und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen (interstitielle Lokalisation, n=9); r=Pearson Korrelationskoeffizient, Signifikanz: \*p<0,05

## 4 Diskussion

### 4.1 Gewicht, Plasma-Cholesterin- und Plasma-Triglyceridspiegel

#### 4.1.1 Gewicht

Die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse waren nach 20 Wochen CED signifikant leichter als WT Mäuse. Eventuell akkumulieren die in der CED enthaltenen Lipide im Blut und können durch das Fehlen von ApoE zu geringeren Teilen in der Leber aufgenommen, verstoffwechselt und somit in Körpermasse umgesetzt werden.

Die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse waren nach 20 Wochen CED signifikant schwerer als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (38g vs. 33g), nach NF jedoch signifikant leichter als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (29g vs. 34g). Statistische Untersuchungen ergaben eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Einflussfaktoren Futter und Genotyp bei den ApoE<sup>-/-</sup> und PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Das heißt, dass das Futter (NF oder CED) einen Einfluss darauf hat, inwieweit sich der Effekt durch die ApoE- bzw. die PACAP-Defizienz überhaupt ausprägen kann.

Tomimoto et al. (2008) berichteten über ein reduziertes Gewicht und eine verringerte Nahrungsaufnahme bei PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen. Auch PACAP<sup>-/-</sup>/VIP<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten deutlich weniger Wachstum und verringertes Körpergewicht im Vergleich zu WT Mäusen (Niewiadomski et al. 2008). Bei PACAP-defizienten Mäusen wurde ein rascher Kräftezerfall und Gewichtsverlust gefunden, gefolgt vom Tod der Tiere in der zweiten postnatalen Woche (Gray et al. 2001). Einige Tiere starben plötzlich und ohne Kachexie, einige ausgezehrt nach einem langsamen Sterbeprozess (Gray et al. 2001). Als ursächlich wird hier eine kardiovaskuläre Problematik vermutet: Neben Hypertension im Herzen bestand eine verminderte Kontraktilität durch den Wegfall der PACAP-vermittelten Vasorelaxation und des positiv inotropen Effektes (Gray et al. 2001).

PACAP bewirkt über die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor PAC1 einen hemmenden Einfluss auf Appetit, Sättigungsgefühl und somit auch das Gewicht (Harmar et al. 2012; Vu et al. 2015). Dieser „anorektische“ Effekt zeigt sich nicht nur bei Applikation von PACAP, sondern auch bei Verwendung eines VPAC-1 Agonisten, beides vermittelt über den VPAC1 Rezeptor (Yu et al. 2008) und konnte sowohl zentral als auch peripher ausgelöst nachgewiesen werden (Vu et al. 2015; Iemolo et al. 2015). Zum einen zeigt sich durch eine PACAP-Defizienz also eine Verringerung der Körpermasse und des

Gewichts, so zum Beispiel bei unseren PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen NF (im Vergleich zur ApoE<sup>-/-</sup> Kontrolle), sowie in den o.g. Studien von Gray et al. (2001), Niewiadomski et al. (2008) und Tomimoto et al. (2008). Zum anderen scheint sich unter CED/hochfetthaltiger Nahrung der in der Literatur beschriebene „anorektische“ Effekt von PACAP auszuprägen, so wie bei unseren PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 20 Wochen CED und den Mäusen bei Yu et al. (2008). Der Einfluss von intraperitoneal appliziertem VPAC1-Agonisten wurde bei Yu et al. (2008) leider nicht bei Tieren unter NF untersucht, was diesbezüglich sicherlich aufschlussreich gewesen wäre. Der Einflussfaktor Futter, speziell der CED, scheint neben der Gendefizienz bedeutsam für die Ausprägung des Effektes von PACAP in Mäusen zu sein.

Das Fehlen von PAC1 und PACAP löst außerdem Veränderungen im Verhalten der Tiere aus. So zeigen PACAP-defiziente Mäuse Hyperaktivität und vermehrten explorativen Bewegungsdrang, ein explosives Springen und verminderte Angst (Hashimoto et al. 2001). Auch an PAC1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich ein reduziertes Angstverhalten und vermehrter Bewegungsdrang (Otto et al. 2001b). Eine weitere Erklärung für ein geringeres Gewicht bei PACAP- bzw. PAC1-Defizienz könnte also auch die vermehrte Bewegung der Mäuse sein, die den Stoffwechsel anregt. Allerdings ist auch denkbar, dass die Mäuse durch die erhöhte Mobilität mehr Muskelmasse ausbilden, was letztendlich wiederum in einer Gewichtszunahme resultieren würde. Diesbezügliche Untersuchungen der Skelettmuskulatur (Fasertypen (Anzahl; Größe) etc.) am M. gastrocnemius und M. soleus laufen aktuell in der AG Kinscherf.

### 4.1.2 Plasma-Cholesterinspiegel

Erwartungsgemäß zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Futtertyp und Cholesterinspiegeln im Blut: In allen untersuchten Mäusegenotypen waren die Plasma-Cholesterinspiegel nach 20 Wochen CED signifikant höher als nach NF. Die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse unserer Studie zeigten nach 20 Wochen CED 9fach höhere Cholesterinspiegel als die WT Mäuse, was den massiven Einfluss des ApoE bzw. dessen Defizienz auf den Cholesterinspiegel im Blut zeigt. Die Defizienz von PACAP bzw. PAC1 führte bei unseren Mäusen zu keinen signifikant veränderten Plasma-Cholesterinspiegeln im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup> (Kontrolle), weder unter NF noch unter CED.

Aus dem hochfetthaltigen Futtertyp resultierend erhöhte Cholesterinspiegel konnten auch Yu et al. (2008) und Wang et al. (2009) an Mäusen zeigen. Bei Wang et al. (2009) wurden WT Mäuse zwölf Wochen mit einer fettreduzierten Nahrung (Kontrollgruppe) oder mit einer Western-Type Diet (dieselbe wie in unserer Studie, CED, TD.88137, 42% Fett) gefüttert. Nach CED waren die Cholesterinspiegel um 78% höher als die der Kontrollgruppe. Verglichen mit Wang et al. (2009) führte die um acht Wochen längere Fütterung der Mäuse in unserer Studie mit demselben Futter zu 5% höheren Cholesterinspiegeln.

Der KO von ApoE bedingt eine Hypercholesterinämie. Unter CED war der Cholesterinspiegel der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse um knapp 200mg/dl höher als derjenige der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Bei ApoE-Defizienz kommt es zu einer verminderten Aufnahme von Lipoproteinen in der Leber und damit zu deren Akkumulation in der Blutbahn, was die erhöhten Plasma-Spiegel eindeutig zeigen. Ishimura et al. (2009) fanden bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 24 Wochen NF im Vergleich zu den in unserer Studie nach 20 Wochen NF gemessenen Konzentrationen um 41,5% höhere Cholesterin- (713,5±223,7 mg/dl) und um 89,3% höhere Triglyceridspiegel (159,1±91,6 mg/dl). Die um vier Wochen längere Fütterungsdauer scheint hierfür ursächlich zu sein. Yu et al. (2008) konnten zeigen, dass bei Mäusen, die mit hochfetthaltiger Nahrung gefüttert wurden, die exogene intraperitoneale Gabe eines VPAC1-Agonisten die Cholesterinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe dosisabhängig signifikant senkt. Die PACAP bzw. PAC1 Defizienz hatte bei unserer Untersuchung keinen Einfluss auf die Cholesterinspiegel nach CED. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse von Yu et al. (2008) und uns, dass VIP als VPAC1-Agonist, und nicht PACAP, bei der Senkung des Cholesterinspiegels involviert zu sein scheint. Möglicherweise bewirkt aber auch die gezielte exogene Verabreichung eines VPAC1-Agonisten eine Reduktion der Cholesterinspiegel, wohingegen das rein endogene Vorhandensein dessen im Organismus diese signifikanten Änderungen der Blutlipide nicht herbeiführen kann. Über den VPAC2 Rezeptor ist eine mögliche Rolle für die Reduktion der Cholesterinspiegel nicht auszuschließen.

Die PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse von Gray et al. (2001) wiesen schon nach wenigen Tagen signifikant höhere Plasma-Cholesterinspiegel als die WT Mäuse auf, die meisten starben bereits nach wenigen Tagen. Die Art der Fütterung ist nicht genannt. Wir konnten keinen

derartigen Kräfteverfall oder einen Einfluss auf die Cholesterinspiegel bei PACAP-defizienten Mäuse beobachten, möglicherweise spielten bei Gray et al. (2001) noch andere, nicht eruierbare Einflussfaktoren eine Rolle.

### 4.1.3 Plasma-Triglyceridspiegel

Unsere Daten zeigen, dass ausschließlich PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> unter CED einen Einfluss auf die Triglyceridspiegel im Blut zu haben scheint im Vergleich zum ApoE-KO. Das kann beispielsweise mit einer erhöhten Nahrungsaufnahme als Resultat des fehlenden Appetit-dämpfenden Effekts durch PACAP erklärt werden (Yu et al. 2008; Vu et al. 2015). Der Einfluss des Futters auf die TAG im Blut wurde bereits in der Literatur gezeigt: Mäuse und Ratten zeigten durch CED erhöhte Triglyceridspiegel (Wang et al. 2009; Stemmer et al. 2012). ApoE<sup>-/-</sup> und PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen bereits in anderen Untersuchungen signifikant höhere Triglyceridspiegel auf als WT Mäuse (Gray et al. 2001; Ishimura et al. 2009). Die intraperitoneale Gabe des VPAC1 Agonisten bei gleichzeitiger Fütterung einer CED über 28 Tage führte bei Mäusen zu einer dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der Plasma-Triglyceride (Yu et al. 2008). Diese Befunde können unsere Daten erklären, da PACAP einer der VPAC1 Agonisten ist und bei dessen Defizienz sich in unserer Studie erhöhte TAG-Spiegel unter CED zeigten. Allerdings ist auch VIP ein Agonist von VPAC1, und dessen Beeinflussung der TAG-Spiegel im Vergleich zu PACAP kann mit den vorliegenden Untersuchungen nicht differenziert betrachtet werden. Die Beteiligung von VPAC2 an reduzierten TAG-Spiegeln nach CED-Fütterung ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Dass wir bei PAC1-Defizienz im Unterschied zu PACAP-Defizienz jedoch keine signifikant veränderten TAG-Spiegel zeigen konnten, zusammengekommen mit den Ergebnissen von Yu et al. (2008), legt nahe, dass VPAC1 hier der entscheidende Rezeptor ist.

## 4.2 Morphologie

### 4.2.1 Anzahl Nierenkörperchen

Es gibt in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Anzahl von Glomeruli und deren quantitativen Veränderungen. Der Einfluss von PACAP bzw. PAC1 wurde bislang nicht untersucht. Unsere PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 20 Wochen CED signifikant mehr Nierenkörperchen als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Kontrolle). Langheinrich et al. fanden bei

ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Anzahl an Glomeruli im Vergleich zu WT Mäusen (Langheinrich et al. 2010). Auf einen Einfluss von ApoE-Defizienz auf die Anzahl der Nierenkörperchen im Nierenkortex weisen unsere Daten nicht hin. Konditionen, die die Anzahl der Nierenkörperchen beeinflussen können sind u.a. Alter und Blutdruck. Mit dem gesunden Alterungsprozess nimmt das kortikale Nierenvolumen und ebenso die Zahl der Nephronen und somit der Nierenkörperchen ab (Glassock und Rule 2012; Hommos et al. 2017). Die Gesamtzahl der Glomeruli ist mit dem Blutdruck invers korreliert: So zeigen hypertensive Patienten signifikant weniger Glomeruli als normotensive (Keller et al. 2003; Müller und Kuhlencordt 2017). In unserer Studie scheint die hypotensive Wirkung von PACAP auf den Blutdruck nicht einflussreich genug zu sein, um die Anzahl der Glomeruli zu beeinflussen und deshalb nicht ursächlich für die erhöhte Anzahl an Glomeruli. Aufgrund der o.g. Literatur ist nicht zu vermuten, dass der Wegfall des hypotensiven Einflusses von PACAP zu einer erhöhten Anzahl an Glomeruli führt. Dass eine renale Schädigung die Glomeruli in Anzahl und Größe beeinflusst, zeigten Xie et al. (2018): Eine Adriamycin-induzierte Nephropathie senkte die Zahl der Glomeruli signifikant und die Heterogenität des Volumens der im äußeren und mittleren Cortex gelegenen Glomeruli nahm zu.

### 4.2.2 Fläche und Durchmesser der Nierenkörperchen

Nach CED zeigten die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse bezogen auf die Fläche größere Nierenkörperchen als die WT Mäuse bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Die PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen auch beim Durchmesser signifikant kleinere Nierenkörperchen auf als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse, sowohl nach NF als auch nach CED.

Unsere Daten zeigen ebenso wie die von Langheinrich et al. (2010), dass ApoE-Defizienz sich auf die Größe der Glomeruli auswirkt. ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen nach 80 Wochen signifikant größere Glomeruli auf als WT Mäuse (Langheinrich et al. 2010). Ursächlich für die Volumenzunahme könnten die geweiteten Kapillaren und/oder die perivaskuläre Entzündungsreaktion sein, die sich bei den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten (Langheinrich et al. 2010). Sie zeigten außerdem fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen und bei 41% der Glomeruli Anzeichen für eine Lipoprotein-assoziierte Glomerulopathie, bei der sich in den glomerulären Kapillaren abnormale Lipoproteine ablagern. Denkbar ist auch

eine reaktive Zunahme des Gefäßvolumens und damit der Glomeruli durch die Ablagerungen.

Unsere Ergebnisse, bei denen wir nach Fütterung einer CED bei WT Mäusen und bei PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant kleinere Glomeruli als bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontrolle) zeigen konnten, sind dahingehend im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Daten, dass die CED einen Einfluss auf die Morphologie und Pathologie der Glomeruli hat. In einigen Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine CED zu glomerulären Schäden führt (Langheinrich et al. 2010). ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse, die 16 Wochen mit hochfetthaltiger Nahrung (60% Fett, allerdings ohne zusätzliches Cholesterin) gefüttert wurden, entwickelten signifikant größere Glomeruli als solche, die Nahrung mit geringem Fettgehalt erhielten (Maimaitiyiming et al. 2015). Bei den Mäusen unserer Studie konnten wir, wie bereits o.g., signifikante Größenunterschiede der Glomeruli zwischen WT bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup> unter CED zeigen, allerdings konnten keine Signifikanzen unmittelbar zwischen der Fütterung mit NF oder CED nachgewiesen werden. Maimaitiyiming et al. (2015) haben glomeruläre Flächen von 3000 bis ca. 4500  $\mu\text{m}^2$  bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen, Wang et al. (2014) hingegen fanden bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen, die 16 Wochen cholesterinangereicherte, hochfetthaltige Nahrung erhielten, glomeruläre Flächen von ca. 7000  $\mu\text{m}^2$ , ähnliche wie die unserer ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Ursächlich für diese Unterschiede kann z.B. die Messmethode sein, bei der bei uns ausschließlich Glomeruli mit angeschnittenem Harn- und Gefäßpol ausgemessen wurden. Auch die längere Dauer der Fütterung (bei uns 20 Wochen) und die Art der Futterzusammensetzung (Anteil Protein/Kohlenhydrat/Fett/ggf. zusätzliches Cholesterin wie bei uns und Wang et al. (2014) scheinen zu größeren Glomeruli zu führen.

Neben tierexperimentellen Daten zeigt ein Blick in humane Studien, dass die Adipositas beim Menschen im Zusammenhang mit Glomerulomegalie steht. Ein Zusammenhang zwischen Body Mass Index und Durchmesser der Glomeruli ist nachgewiesen (Kataoka et al. 2011; Gigante et al. 2017). Eine massive Vergrößerung der Glomeruli als repräsentative strukturelle Komponente der renalen Hypertension wird diskutiert (Okabayashi et al. 2018). Weitere denkbare Gründe sind lymphohistozytäre Infiltrationen. Umgekehrt könnten im fortgeschrittenen Stadium die Glomeruli aufgrund von Minderdurchblutung und dadurch bedingten Funktionseinbußen verkleinert bzw.



atrophisch sein. Nicht nur pathologische, sondern auch physiologische Prozesse wie z.B. das (gesunde) Altern bedingen renale Strukturveränderungen. Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl der Glomeruli, die glomeruläre Größe hingegen nimmt (kompensatorisch) zu (Glassock und Rule 2012). Eine PACAP-Defizienz beschleunigt den Alterungsprozess (Reglodi et al. 2018). Die Mäuse unserer Studie zeigten keine morphologischen Veränderungen wie lymphohistozytäre Infiltrate oder bindegewebige Zubildungen in oder um Glomeruli, Tubuli oder Gefäße, die sich wahrscheinlich erst ab einem höheren Alter manifestieren würden. Möglicherweise sind die Glomeruli beim PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> dadurch kleiner, dass PACAP lediglich an den VPAC-Rezeptoren binden kann und eine sympathische, vasokonstriktorische bzw. tonisierende Wirkung überwiegt, die einer ApoE<sup>-/-</sup>-vermittelten Dilatation entgegenwirkt.

### 4.2.3 Relativer Anteil Bindegewebe im Nierenkortex

Unsere Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Anteil des Bindegewebes im renalen Kortex der untersuchten Mäusegenotypen. Somit ergibt sich kein Hinweis, dass die Defizienz von ApoE, PACAP bzw. PAC1 Mäusen nach 20 Wochen NF oder CED Einfluss auf eine vermehrte Fibrosierung bewirkt. Maimaitiyiming et al. (2015) konnten an ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach Fütterung einer hochfetthaltigen Nahrung signifikant mehr renales Bindegewebe als nach niedrigfetthaltiger Nahrung zeigen. Eine renale Kollagenanreicherung bei mit hochfetthaltiger Nahrung gefütterten ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen haben auch Chen et al. (2018) beobachtet. PACAP konnte in Nieren von Mäusen, die mit Cyclosporin A behandelt wurden, die aus diesem Reiz resultierende Expression von TNF $\alpha$  sowie des profibrotischen Zytokins TGF $\beta$ 1 (Transforming-Growth-Factor beta 1) reduzieren und so die Fibrose verhindern (Khan et al. 2011). Und auch im Herzen konnte PACAP sowohl unter Zellkulturbedingungen als auch in einer Studie mit PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen die Fibroserate im medikamentös vorgeschädigten Herzen reduzieren (Sano et al. 2002; Mori et al. 2010). Die Zubildung von Bindegewebe in der Niere ist altersabhängig, so fanden Uneda et al. (2017) bei 22 bis 25 Monate alten WT Mäusen 21,2%  $\pm$  2,9% tubulointerstitielle Fibrose, bei jungen Mäusen (3 bis 4 Monate) war es signifikant weniger (ca. 5%). Eine Fibrose der Niere, ausgelöst als eine Art „Plan-B“ oder zweite Wahl Heilungsprozess, tritt auf, wenn Reparaturmechanismen insuffizient sind oder wegen anhaltender, chronischer Entzündung und Schädigung des Gewebes gestört sind

(Cao et al. 2015). Es entsteht Narbengewebe, einhergehend mit einer „loss of function“ in diesen Arealen. Denkbar ist, dass eine Fibrose bzw. eine beginnende Nephrosklerose erst nach einem längeren Untersuchungs- und Lebenszeitraum der Mäuse erkennbar wird.

### 4.3 Immunhistochemie

#### 4.3.1 Makrophagen: MOMA-2 und F4/80

Generell zeigten die Nieren histologisch und immunhistochemisch wenige Makrophagen und Leukozyten. Signifikant unterschiedlich war die Dichte MOMA-2<sup>+</sup> Makrophagen bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen und WT Mäusen nach CED: Die ApoE-Defizienz verstärkt die Makrophagen-Einwanderung unter CED. Die Abwesenheit der antiinflammatorischen Eigenschaft von PACAP bei dessen Defizienz zeigt in unserem Mausmodell keinen Anstieg der Dichte MOMA-2<sup>+</sup> Zellen.

Der Antikörper F4/80 erkennt ein membranständiges Glykoprotein und ist der spezifischste Antikörper für den Nachweis von reifen, residenten Makrophagen bei der Maus (Cao et al. 2015). Wir fanden heraus, dass die Gabe von CED bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem signifikanten Unterschied in der F4/80<sup>+</sup> Zellzahl führte: Nach 20 Wochen CED wiesen ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse eine 2,5fach höhere Dichte residenter (F4/80-immunreaktiver) Makrophagen auf als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach NF. Auch Cui et al. (2013) zeigten einen Einfluss der Nahrung auf die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in der Mäuseniere: Übergewichtige WT Mäuse wiesen nach 16 Wochen hochfetthaltiger Diät eine signifikant gesteigerte Makrophagen-Infiltration in Glomeruli und Interstitium auf im Vergleich zu normalgefütterten WT Mäusen. Diese und unsere Daten weisen auf einen Einfluss der Ernährung (fett-, cholesterinreiche Nahrung) auf die Dichte/das Vorkommen von Makrophagen und damit möglicherweise auf den Entzündungsstatus des renalen Gewebes hin.

Zudem fanden wir bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach CED signifikant mehr F4/80<sup>+</sup> Makrophagen als bei PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Es ergab sich zwischen den ApoE<sup>-/-</sup> und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen eine statistisch signifikante Wechselwirkung bzgl. der Einflussfaktoren Futter und Genotyp. Das bedeutet, dass die Art des Futters einen Einfluss darauf hat, inwieweit sich der Effekt durch die ApoE- bzw. die PAC1-Defizienz überhaupt ausprägen kann. Unter NF zeigen die PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse etwa gleich viele, nach CED signifikant

weniger F4/80<sup>+</sup> Makrophagen als ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED. PAC1-Defizienz scheint also inhibitorisch auf die Anzahl/Dichte residenter Makrophagen unter CED zu wirken. Da PACAP dem Organismus noch zur Verfügung steht, könnte PACAP durch die Bindung an VPAC-Rezeptoren die unspezifische Immunantwort über das Monozyten-/Makrophagensystem hemmen und so eine antiinflammatorische Wirkung ausüben.

Es ist auch möglich, dass weniger Makrophagen bei PAC1-Defizienz heranreifen und resident werden können, weil sie entweder früher zu Grunde gehen oder rezirkulieren, da sich bei den F4/80<sup>+</sup> Makrophagen ein Unterschied in der Zellzahl zeigt, bei MOMA-2 nicht. Die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED zeigten die größte Zahl residenter Makrophagen. Möglicherweise transmigrieren mehr Monozyten aus dem Blut aufgrund gesteigerter Zytokinproduktion im renalen wie auch peripheren Fettgewebe und renaler vaskulärer sowie parenchymatöser Lipidakkumulationen zu residenten Gewebsmakrophagen. Mittels ORO-Färbung haben wir überprüft, ob F4/80<sup>+</sup> Zellen durch die CED induzierte, akkumulierte Lipide phagozytieren, konnten aber keinen Zusammenhang herstellen.

Bei den 80 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Mäusen von Langheinrich et al. fanden sich perivaskulär große Cluster inflammatorischer Zellen, vornehmlich Leukozyten und Plasmazellen (Langheinrich 2010). Diese Beobachtung konnten wir in unseren Mäusen nicht machen, es fanden sich weder perivaskulär noch in anderen Bereichen der Nieren große zelluläre Ansammlungen im Sinne einer inflammatorischen Zellantwort. Möglicherweise war unser Untersuchungszeitraum hierfür mit 30 Wochen zu kurz. In einem renalen Ischämie/Reperfusionsmodell von Lee et al. (2011) zeigte sich eine auf die Schädigung hin erhöhte Zahl an F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, die über die Dauer der Regenerationsphase deutlich erhöht blieb. Sie vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass die Makrophagen einen Phänotypen-Wechsel von inflammatorischen Makrophagen in der akuten Phase zu antiinflammatorischen Makrophagen in der Reparatur-Phase vollziehen und an der Reparatur der Niere beteiligt sein könnten (Lee et al. 2011). Die PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse im Modell renaler Ischämie/Reperfusion reagierten mit signifikant höherer Makrophagen-Infiltration als der WT, was die Rolle von PACAP als antiinflammatorisches Peptid anhand eines akuten Geschehens unterstreicht (Szakaly et al. 2011). In unserer Untersuchung, die im Gegensatz zu den o.g. Studien einen chronischen Prozess ohne starke Noxe abbildet, konnten wir bei PACAP-defizienten

Mäusen keinen signifikanten Anstieg von Makrophagen finden und daher keinen signifikanten Nachweis für dessen antiinflammatorische Wirkung aufzeigen.

### 4.3.2 Zytokine: IL-6 und TNF $\alpha$

Unsere Untersuchung zeigt einen Einfluss auf die Dichte der renalen IL-6<sup>+</sup> Zellen durch die Art des Futters (NF vs. CED): Bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen waren nach CED in den Tubuli um 46% mehr und in den Glomeruli um 99,5% mehr IL-6<sup>+</sup> Zellen als bei den Mäusen unter NF. Auch in den Tubuli der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse fanden wir eine signifikant um 30% höhere Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen nach CED als nach NF. In diesem Zusammenhang ist bereits beschrieben, dass Western-Type Diet gefütterte Mäuse renal eine signifikant erhöhte mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF $\alpha$  und MCP-1 aufweisen (Wang et al. 2009; Cui et al. 2013). Da im Fettgewebe dauerhaft eine geringgradige Inflammation durch permanente Freigabe und erhöhte Werte von Adipozytokinen herrscht (Gregor und Hotamisligil 2011; Stemmer et al. 2012), sind neben IL-6 und TNF $\alpha$  auch eine Reihe anderer proinflammatorischer Zytokine erhöht (Yudkin et al. 2000; Gregor und Hotamisligil 2011). Unsere und die Ergebnisse anderer deuten also darauf hin, dass die Gabe einer CED in der Niere zu einer erhöhten IL-6 Produktion führen kann.

Eine antiinflammatorische Wirkung von PACAP kann aus der Hemmung/Verminderung der Expression proinflammatorischer Zytokine resultieren: So konnte gezeigt werden, dass PACAP in Podozyten-Zellkulturen die IL-6 (und MCP-1) Expression signifikant erniedrigt (Sakamoto et al. 2015). Da wir *in vivo* bzgl. der renalen Dichte IL-6<sup>+</sup> Zellen weder einen signifikanten Unterschied bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>, noch bei PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen fanden, können wir diese *in vitro* erhobenen IL-6 betreffenden Befunde nicht bestätigen.

Die Untersuchungen der Dichte der renalen TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen zeigten bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach NF eine signifikant um 22% höhere Dichte an tubulären TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als nach CED. Nach NF fanden wir bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen in den Tubuli eine um 19% geringere Dichte an TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen als bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Wie oben bereits beschrieben, bewirkt die Gabe eines fetthaltigen Futters und/oder Übergewicht eine erhöhte Zytokin-Produktion. Dass sich bei NF eine höhere Dichte an TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen zeigt und PACAP-KO die Dichte TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen senkt, ist unerwartet. Beides zeigt sich nur in den Tubuluszellen, wir

konnten in den anderen untersuchten Nierenkompartimenten weder glomerulär, vaskulär noch interstitiell ein derartiges Ergebnis zeigen.

Im Tubulussystem zeigt sich zwar die höchste Dichte von IL-6<sup>+</sup> und TNFα<sup>+</sup> Zellen, eine positive Korrelation zwischen der Dichte von IL-6<sup>+</sup> und TNFα<sup>+</sup> Zellen konnte jedoch nur nach CED im Interstitium der PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse und vaskulär bei den PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden.

Die Literatur zeigt vielfach die antiinflammatorische Wirkung von PACAP über die Hemmung der Expression/Produktion proinflammatorischer Zytokine: Exogen zugeführtes PACAP bewirkt eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und profibrotischen Substanzen (Reglodi et al. 2012a; Eneman et al. 2016). Durch die Gabe von PACAP wurde die Zytokin-Produktion von TNFα sowohl *in vitro* in humanen Tubulusepithelzellen als auch *in vivo* bei diabetischen und durch Multiples Myelom induzierten Nephropathien gesenkt (Arimura et al. 2006). Hiernach wäre zu erwarten gewesen, dass sich bei unseren PACAP-defizienten Mäusen eine erhöhte TNFα<sup>+</sup> Zelldichte zeigt, auch tubulär. Die durch PACAP geminderte TNFα Produktion in der Untersuchung von Arimura et al. (2006) wurde durch einen PAC1-Inhibitor (M65) zusätzlich verstärkt, was darauf hindeutet, dass der PAC1-Rezeptor am Prozess der Zytokin-Senkung durch PACAP beteiligt ist. Wir konnten nur bei PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen, nicht bei PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen, signifikante Unterschiede in der Dichte der tubulären TNFα<sup>+</sup> Zellen zeigen und somit in unserem Modell keinen Einfluss/kein Mitwirken des PAC1-Rezeptors nachweisen. Dass PACAP die auf einen schädigenden Reiz hin (Cisplatin, Ischämie) reaktive TNFα-Produktion in der Niere senken kann, wurde außerdem *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Li et al. 2010; Li et al. 2011). Wir konnten bei unserem vergleichsweise milden „Reiz“, bestehend in der Ernährung mit CED und den daraus resultierenden proinflammatorischen Konditionen, im Vergleich zu derart starken Noxen wie in den o.g. Untersuchungen keinen hemmenden Einfluss von PACAP auf die TNFα<sup>+</sup> Zelldichte zeigen, dagegen fanden wir tubulär einen Anstieg der TNFα<sup>+</sup> Zelldichte nach NF im Vergleich zu CED bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen.

Anhand von Nieren-Homogenaten haben Reglodi et al. (2018) Veränderungen der renalen Zytokine bei PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen gefunden: insbesondere bei alternden PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen (13 bis 24 Monate) zeigten sich teilweise dramatisch erhöhte Zytokine und eine Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Sie diskutieren eine

möglicherweise hierdurch beeinflusste Mikroumgebung, welche die von ihnen gefundenen vermehrten Amyloid-Ablagerungen in diversen Organen, insbesondere in der Niere, und den damit einhergehenden vorzeitigen Alterungserscheinungen bei PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen begünstigen könnte (Reglodi et al. 2018). Die renalen amorphen Amyloid-Ablagerungen zeigten sich hauptsächlich in den Glomeruli, nicht in Interstitium und Tubulussystem (Reglodi et al. 2018). Die Studie zeigt also, dass die Zytokine deutlich von der PACAP-Defizienz und den durch Alterung bedingten Amyloid-Ablagerungen beeinflusst werden und nicht nur durch inflammatorische Einflüsse und Konditionen oder zugefügte Noxen. Wir konnten bei unseren PACAP<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (ApoE<sup>-/-</sup>) keine erhöhte Dichte an TNFα<sup>+</sup> oder IL-6<sup>+</sup> Zellen zeigen. Mit einem Alter von 7,5 Monaten sind unsere Mäuse nach der Einteilung von Reglodi et al. (2018) der jungen Mausgruppe zugehörig, in welcher die Zytokin-Veränderungen, anders als in der alternden Gruppe, nicht signifikant waren.

Die histologische und immunhistochemische Betrachtung/Untersuchung der Nieren der vorliegenden Studie zeigte eine eher geringe Infiltration durch Makrophagen und andere Leukozyten, hingegen war die Dichte an TNFα<sup>+</sup> und IL-6<sup>+</sup> Zellen relativ hoch. Die meisten renalen Zellen wie Endothelzellen, Mesangiumzellen, epitheliale Zellen und Podozyten produzieren nach Aktivierung durch einen schädigenden Reiz, Infektion oder Verletzung proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, was dazu führt, dass die Niere durch diverse Immunzellen infiltriert wird, die wiederum auch Zytokine exprimieren (Banki et al. 2013). Denkbar ist, dass die Dichte der Zytokin-positiven Zellen in den Nieren zum Untersuchungszeitpunkt hoch ist, der Peak der sekundär eingeleiteten Infiltration durch Immunzellen aber erst noch folgt. Die Positivkorrelation zwischen vaskulärem TNFα und IL-6 könnte darauf hindeuten, dass ein Zusammenhang zwischen deren Expression und Sekretion besteht, wie auch schon von Yudkin et al. (2000) gezeigt wurde und ein Grund für die hohe Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen ist. IL-6 wird von aktivierten Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten, Adipozyten und auch von Tubulusepithelzellen der Niere exprimiert (Heinrich et al. 1990; Yudkin et al. 2000; Feng et al. 2017).

Andere Ursachen für erhöhte IL-6 Präsenz können Übergewicht, Katecholamin-Ausschüttung und auch psychosozialer Stress sein (Yudkin et al. 2000). Den Einfluss von Übergewicht konnten wir dahingehend bestätigen, dass die PACAP<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED

signifikant schwerer als nach NF waren und im Tubulussystem und in den Glomeruli eine höhere Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen zeigten. Möglicherweise haben die Mäuse vor ihrer Tötung zB. durch den Transport und ungewohnte äußere Umstände Stress empfunden und dadurch vermehrt Katecholamine ausgeschüttet, was sich in den IL-6<sup>+</sup> Zellen widerspiegelt.

Die proinflammatorischen Zytokine im Allgemeinen und IL-6 im Speziellen, haben durch ihre Signalwege Auswirkungen auf den gesamten Organismus. IL-6 Level, gemessen in scheinbar gesunden Populationen, prognostizieren ein zukünftiges vaskuläres Risiko, das mit endothelialer Dysfunktion, Versteifung von Arterien und dem Ausmaß subklinischer Atherosklerose korreliert (Mahmud und Feely 2005; Esteve et al. 2007; Lee et al. 2007; Ridker 2016). In der Pathologie der Atherosklerose stehen inflammatorischen Zellen, insbesondere Makrophagen und deren Infiltration der Plaques, außerdem Zyto- und Chemokine sowie die Verbindung von CVD und inflammatorischen Serum-Markern wie C-reaktives Protein und IL-6 im Vordergrund (Karasawa und Takahashi 2017). Neben dieser inflammatorischen Komponente der Atherosklerose spielt auch der gestörte Lipidstoffwechsel bei deren Entstehung eine Schlüsselrolle. Durch die CED und den KO von ApoE haben wir bei unseren Mäusen in den Lipidstoffwechsel eingegriffen, um pro-atherogene Bedingungen in der Niere zu schaffen und inflammatorische Reaktionen zu untersuchen.

An der Entstehung der Atherosklerose sind komplexe und vielschichtige, sich gegenseitig bedingende inflammatorische Einflüsse und Mechanismen beteiligt. Unsere untersuchten Nieren zeigen morphologisch (noch) keine bindegewebige Zubildung im Zuge einer Nephrosklerose, jedoch ist IL-6 im Tubulussystem und im Interstitium der Rindenregion, insbesondere unter CED, erhöht. Erhöhte Entzündungswerte im Körper können wiederum atherosklerotische Prozesse vorantreiben und das Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, ansteigen lassen (Ridker 2016).

Die antiinflammatorische Wirkung von PACAP bzw. PAC1 in der Niere konnte in unserer Studie nicht hinreichend gezeigt werden. Morphologische Auswirkungen durch PACAP- bzw. PAC1-Defizienz auf Anzahl, Fläche und Durchmesser der Glomeruli wurden jedoch sichtbar.

#### 4.4 Kritik und Ausblick

Um chronische, morphologische und/oder inflammatorische Effekte in der Niere nachweisen zu können, müsste der Untersuchungszeitraum länger gewählt werden. Auch eine Messung des Plasma-IL-6-Spiegels wäre zur Beurteilung von Organveränderungen hilfreich. Eine Limitation der Studie ist das Fehlen von NF WT Mäusen, da der Vergleich mit einer neutralen Ausgangsgruppe bezüglich einiger Aspekte aufschlussreich wäre. Interessant wird die Auswertung anderer Organsysteme der hier untersuchten Tiere bezüglich derselben Parameter.

Untersuchungsgegenstand zukünftiger Studien könnte sein, die antiinflammatorische Rolle von PACAP (und VIP) an Primärzellkulturen zu untersuchen. An (vorgeschiedigten) Nierenepithelzellen könnten morphologische Veränderungen sowie Zytokinausschüttung mit oder ohne PACAP-Substitution analysiert werden. Denkbar wäre auch medikamentös oder durch oxLDL vorgeschädigte renale Zellen (z.B. glomeruläre und tubuläre Zellen) dahingehend zu untersuchen, ob PACAP hier den resultierenden Schaden abmildern kann und seine antiinflammatorische, antiapoptotische und antioxidative Eigenschaft zeigt (oxidativer Stress, Apoptosemarker, wie aktivierte Caspase3 und andere).

PACAP ist bereits seit einigen Jahren Gegenstand der intensiven Forschung. Dennoch bieten die (Aus-)Wirkungen von PACAP und seiner Rezeptoren im Organismus noch vielseitige Forschungsansätze für weitere Untersuchungen, zum Beispiel bezüglich möglicher Therapieansätze durch seine zytoprotektive Wirkung.



## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems waren im Jahr 2015 mit 39% die häufigste Todesursache in Deutschland und sind weltweit ein großes gesundheitliches Problem. Die Atherosklerose nimmt in diesen Pathologien einen nicht zu vernachlässigenden Stellenwert ein. Im entzündlichen Entstehungsprozess der chronischen Gefäßerkrankung spielen Lipidstoffwechsel und Makrophagen eine wichtige Rolle. Das ApoE<sup>-/-</sup> Mausmodell ist etabliert, um Atherosklerose und dessen Einflussfaktoren sowie Nierenerkrankungen zu untersuchen. Das Peptid PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein) gehört zur Glucagon-PACAP-VIP Protein-Superfamilie. Es wirkt antiinflammatorisch, antiapoptotisch und antioxidativ und zeigt diese Eigenschaften auch in der Niere in einem nephroprotektiven Effekt. In dieser Studie wurde erstmals untersucht, inwieweit die Defizienz von PACAP bzw. dessen Rezeptor PAC1 im ApoE<sup>-/-</sup> Mausmodell inflammatorische Reaktionen und morphologische Veränderungen der Niere hervorrufen und/oder beeinflussen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Verabreichung eines cholesterinangereicherten Futters auf diese Parameter untersucht.

**Material und Methoden:** Für die Untersuchung standen folgende Maus-Genotypen zur Verfügung: WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> bzw. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>. Den jeweils zehn Wochen alten Mäusen wurde für 20 Wochen entweder Normalfutter (NF) oder cholesterinangereicherte Nahrung (CED) verabreicht. Es ergaben sich insgesamt sieben Mausgruppen, vom WT gab es nur eine CED Gruppe. Körpergewicht und Plasma-Cholesterin- sowie Triglyceridspiegel wurden gemessen. Nach Tötung der Tiere erfolgte die Organentnahme. Die Nieren wurden kryofixiert. 6µm dünne Kryoschnitte der Niere wurden in einer Azan- und ORO-Färbung histologisch, histomorphometrisch und immunhistologisch mittels der Antikörper MOMA-2 (Monozyten und Makrophagen), F4/80 (vorwiegend residente Makrophagen), TNFα und IL-6 (proinflammatorische Zytokine) gefärbt und analysiert. Anhand der Azanfärbung wurden die Nierenschnitte bezüglich Anzahl, Durchmesser und Fläche der Glomeruli sowie ihres Bindegewebsanteils untersucht und vermessen.

**Ergebnisse:** Die verabreichte CED führte innerhalb der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zu signifikant schwereren Tieren als unter NF. Die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse waren nach CED signifikant schwerer als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Kontrolle). Die PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse waren unter NF jedoch leichter als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Hier besteht eine Wechselwirkung zwischen Gewicht und Genotyp. Die Plasma-Cholesterinspiegel waren nach CED bei ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> und PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant höher als nach NF. Nach CED waren die Plasma-Triglyceridspiegel der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant höher als die der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse. Bei der morphologischen Untersuchung ergab sich nach CED eine signifikant erhöhte Anzahl an Nierenkörperchen bei den PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Fläche der Nierenkörperchen war im Vergleich zu den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach CED bei den PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant um 22%, bei den WT Mäusen um 21% niedriger. Auch bzgl. des Durchmessers der Nierenkörperchen waren diejenigen der PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse bei NF und CED kleiner als bei den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Bezüglich des renalen Bindegewebsanteils bzw. einer möglichen Fibrosierung konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Futtergruppen und Genotypen nachweisen. Die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach CED eine doppelt so hohe Dichte an MOMA-2<sup>+</sup> Zellen im Nierenkortex wie die WT Mäuse. Die PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach CED eine viermal geringere Dichte an F4/80<sup>+</sup> Zellen im Nierenkortex als die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse (Kontrolle). Innerhalb der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse bewirkte die CED eine um 2,5fach höhere Dichte an F4/80<sup>+</sup> Zellen als bei Verabreichung von NF. Der Futterunterschied wirkte sich auch auf die Dichte der IL-6<sup>+</sup> Zellen im Nierenkortex aus: Nach CED zeigten PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse glomerulär und tubulär eine höhere Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen als nach NF. Bei den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen war die Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen im Tubulussystem nach CED höher als nach NF. Die ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Tubulussystem nach NF eine höhere Dichte an TNFα<sup>+</sup> Zellen als nach CED. Nach NF war in den Tubuli von PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen die Dichte an TNFα<sup>+</sup> Zellen signifikant geringer als bei den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen.

**Schlussfolgerung:** Abschließend lässt sich sagen, dass bei den PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach CED kleinere Glomeruli und eine geringere Dichte residenter Makrophagen als bei ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontrolle) gefunden wurden.

Die CED bewirkte eine signifikant höhere Dichte an IL-6<sup>+</sup> Zellen in Glomeruli und Tubuli der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu NF.

## 5.2 Summary

**Background:** Cardiovascular diseases were with 39% the leading cause of death in Germany in 2015 and a worldwide severe health problem. Atherosclerosis has an enormous significant value in that kind of pathologies. In the inflammatory etiology of this chronic vascular disease, lipid metabolism and macrophages play a key role. The ApoE<sup>-/-</sup> mouse model is a well-established model of atherosclerosis. PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide) is part of the glucagon-PACAP-VIP protein-superfamily. It acts antinflammatory, antiapoptotic and antioxidative has nephroprotective effects. In this study the effect of the deficiency of PACAP and its receptor PAC1 is investigated on inflammatory and morphological changes of the murine kidney of ApoE<sup>-/-</sup> mice. Additionally, the impact of cholesterol-enriched diet (CED) on these parameters was examined.

**Methods and Materials:** The following four genotypes of mice were reviewed: WT, ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> and PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>. The ten-week-old knockout-mice were fed for 20 weeks either a standard diet (SD) or a cholesterol-enriched diet (CED). Of WT mice we reviewed only a CED-fed group, so there are seven groups of mice in total. Body weight, plasma-cholesterol and -triglycerides were measured. After euthanizing, organs were collected and shockfrozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Kidney cryosections (6µm) were analyzed by using Azan-, ORO-staining and the antibodies MOMA-2 (monocytes and macrophages), F4/80 (resident macrophages), IL-6 and TNFα (proinflammatory cytokines). Based on Azan-staining the number, area and diameter of the glomeruli were measured as well as the relative percentage of connective tissue in the kidney sections to analyze possibly existing fibrosis.

**Results:** Application of the CED resulted in significant heavier PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice compared to SD. PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice fed with CED were heavier than ApoE<sup>-/-</sup> mice (control). After SD, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice were not so heavy as ApoE<sup>-/-</sup> mice. Relating to the bodyweight, there was an interaction between genotype and nutrition.

After application of the CED, plasma cholesterol levels were higher in ApoE<sup>-/-</sup>, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> and PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> compared to SD and plasma triglyceride levels of PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice were significantly higher than in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

After quantification of morphology in PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice after CED the number of glomeruli was increased in comparison with ApoE<sup>-/-</sup> mice. After application of CED, in

kidneys of PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> and WT mice the glomerular area was smaller about 22% and 21% in comparison to ApoE<sup>-/-</sup> mice. After both, SD or CED, in kidneys of PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice the glomeruli were smaller related to diameter than in ApoE<sup>-/-</sup> mice. Regarding the relative percentage of connective tissue and hence a possible renal fibrosis/sclerosis in the kidneys, we could not show any difference between the types of nutrition or genotypes. After application of CED, ApoE<sup>-/-</sup> mice showed a twofold higher density of MOMA-2<sup>+</sup> macrophages in the renal cortex than WT. PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice showed four times less density of F4/80<sup>+</sup> macrophages in renal cortex than ApoE<sup>-/-</sup> mice (control). In ApoE<sup>-/-</sup> mice, application of CED resulted in a 2,5-fold higher density of F4/80<sup>+</sup> macrophages than SD. The type of nutrition influenced the density of IL-6<sup>+</sup> cells in renal cortex: After CED, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice showed a higher density of IL-6<sup>+</sup> cells in glomeruli and tubuli than after SD. After CED, in tubuli of ApoE<sup>-/-</sup> mice density of IL-6<sup>+</sup> cells was higher than after SD.

After CED, in tubuli of ApoE<sup>-/-</sup> mice density of TNFα<sup>+</sup> cells was less than after SD. After application of SD, in the tubular cells of PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice the density of TNFα<sup>+</sup> cells was less than in ApoE<sup>-/-</sup> mice.

**Conclusion:** Summed up, PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice fed a CED show smaller glomeruli and a reduced density of resident macrophages (F4/80) than ApoE<sup>-/-</sup> mice (control) in renal cortex. After CED, PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice showed significant higher density of IL-6<sup>+</sup> cells in glomerular and tubular cells than after SD.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abad, Catalina; Tan, Yossan-Var (2018): Immunomodulatory Roles of PACAP and VIP. Lessons from Knockout Mice. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 66 (1), S. 102–113. DOI: 10.1007/s12031-018-1150-y.
- Arimura, Akira; Li, Min; Batuman, Vecihi (2006): Treatment of renal failure associated with multiple myeloma and other diseases by PACAP-38. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070, S. 1–4. DOI: 10.1196/annals.1317.093.
- Banki, Eszter; Degrell, Peter; Kiss, Peter; Kovacs, Krisztina; Kemeny, Agnes; Csanaky, Katalin et al. (2013): Effect of PACAP treatment on kidney morphology and cytokine expression in rat diabetic nephropathy. In: *Peptides* 42, S. 125–130. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.02.002.
- Behrends, Jan C. (2010): Physiologie. 93 Tabellen. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-23566>.
- Bonaterra, Gabriel A.; Zugel, Stefanie; Thogersen, Joel; Walter, Sabrina A.; Haberkorn, Uwe; Strelau, Jens; Kinscherf, Ralf (2012): Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. In: *Journal of the American Heart Association* 1 (6), e002550. DOI: 10.1161/JAHA.112.002550.
- Brubel, Reka; Horvath, Gabriella; Reglodi, Dora; Lubics, Andrea; Tamas, Andrea; Kiss, Peter et al. (2011): Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. In: *Transplantation proceedings* 43 (4), S. 1297–1299. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.03.081.
- Cao, Qi; Wang, Yiping; Wang, Xin Maggie; Lu, Junyu; Lee, Vincent W. S.; Ye, Qianling et al. (2015): Renal F4/80+ CD11c+ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in health and in adriamycin nephropathy. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26 (2), S. 349–363. DOI: 10.1681/ASN.2013121336.
- Cardell, Lars Olaf; Hjert, Ola; Uddman, Rolf (1997): The induction of nitric oxide-mediated relaxation of human isolated pulmonary arteries by PACAP. In: *British journal of pharmacology* 120 (6), S. 1096–1100. DOI: 10.1038/sj.bjp.0700992.

- Chade, Alejandro R.; Lerman, Amir; Lerman, Lilach O. (2005): Kidney in early atherosclerosis. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 45 (6), S. 1042–1049. DOI: 10.1161/01.HYP.0000167121.14254.a0.
- Chen, Xiong; Yu, Weihui; Li, Weixin; Zhang, Hailing; Huang, Weijian; Wang, Jingying et al. (2018): An anti-inflammatory chalcone derivative prevents heart and kidney from hyperlipidemia-induced injuries by attenuating inflammation. In: *Toxicology and applied pharmacology* 338, S. 43–53. DOI: 10.1016/j.taap.2017.11.003.
- Cui, Wenpeng; Maimaitiyiming, Hasiyeti; Qi, Xinyu; Norman, Heather; Wang, Shuxia (2013): Thrombospondin 1 mediates renal dysfunction in a mouse model of high-fat diet-induced obesity. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 305 (6), F871-80. DOI: 10.1152/ajprenal.00209.2013.
- Delgado, Mario; Martinez, Carmen; Pozo, David; Calvo, Juan R.; Leceta, Javier; Ganea, Doina; Gomariz, Rosa P. (1999): Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162 (2), S. 1200–1205.
- Eneman, Benedicte; van den Heuvel, Lambertus; Freson, Kathleen; van Geet, Chris; Willemsen, Brigith; Dijkman, Henry; Levchenko, Elena (2016): Distribution and Function of PACAP and Its Receptors in the Healthy and Nephrotic Kidney. In: *Nephron* 132 (4), S. 301–311. DOI: 10.1159/000445035.
- Erdling, Andre; Sheykhzade, Majid; Maddahi, Aida; Bari, Ferenc; Edvinsson, Lars (2013): VIP/PACAP receptors in cerebral arteries of rat. Characterization, localization and relation to intracellular calcium. In: *Neuropeptides* 47 (2), S. 85–92. DOI: 10.1016/j.npep.2012.12.005.
- Eriksson, Einar E.; Xie, Xun; Werr, Joachim; Thoren, Peter; Lindbom, Lennart (2001): Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 194 (2), S. 205–218.
- Esteve, Eduardo; Castro, Antoni; Lopez-Bermejo, Abel; Vendrell, Joan; Ricart, Wifredo; Fernandez-Real, Jose-Manuel (2007): Serum interleukin-6 correlates with endothelial

dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity. In: *Diabetes care* 30 (4), S. 939–945. DOI: 10.2337/dc06-1793.

Fazio, Sergio; Linton, MacRae F. (2001): Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, 515-25.

Feng, Danying; Wang, Yanping; Liu, Yan; Wu, Liping; Li, Xiao; Chen, Yufan et al. (2017): DC-SIGN reacts with TLR4 and regulates inflammatory cytokine expression via NF-kappaB activation in renal tubular epithelial cells during acute renal injury. In: *Clinical and experimental immunology*. DOI: 10.1111/cei.13048.

Ganforina, Maria D.; Do Carmo, Sonia; Martinez, Eva; Tolivia, Jorge; Navarro, Ana; Rassart, Eric; Sanchez, Diego (2010): ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. In: *Glia* 58 (11), S. 1320–1334. DOI: 10.1002/glia.21010.

Gigante, Antonietta; Giannakakis, Konstantinos; Di Mario, Francesca; Barbano, Biagio; Rosato, Edoardo; Pofi, Riccardo et al. (2017): BMI, nephroangiosclerosis and glomerulonephritis. Is there any meeting point? In: *Nephrology (Carlton, Vic.)*. DOI: 10.1111/nep.13155.

Glassock, Richard J.; Rule, Andrew D. (2012): The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney. With an emphasis on the glomeruli. In: *Kidney international* 82 (3), S. 270–277. DOI: 10.1038/ki.2012.65.

Gray, Sarah L.; Cummings, Kevin J.; Jirik, Frank R.; Sherwood, Nancy M. (2001): Targeted Disruption of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Gene Results in Early Postnatal Death Associated with Dysfunction of Lipid and Carbohydrate Metabolism. In: *Molecular Endocrinology* 15 (10), S. 1739–1747. DOI: 10.1210/me.15.10.1739.

Greenow, Kirsty; Pearce, Nigel J.; Ramji, Dipak P. (2005): The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 83 (5), S. 329–342. DOI: 10.1007/s00109-004-0631-3.

Gregor, Margaret F.; Hotamisligil, Gokhan S. (2011): Inflammatory mechanisms in obesity. In: *Annual review of immunology* 29, S. 415–445. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.

Hamelink, Carol; Tjurmina, Olga; Damadzic, Ruslan; Young, W. Scott; Weihe, Eberhard; Lee, Hyeon-Woo; Eiden, Lee E. (2002): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (1), S. 461–466. DOI: 10.1073/pnas.012608999.

Hansson, Göran K. (2005): Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. In: *The New England journal of medicine* 352, 1685-1695. DOI: 10.1056/NEJM200507283530425.

Harmar, Anthony J.; Fahrenkrug, Jan; Gozes, Illana; Laburthe, Marc; May, Victor; Pisegna, Joseph R. et al. (2012): Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. IUPHAR review 1. In: *British journal of pharmacology* 166 (1), S. 4–17. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01871.x.

Hashimoto, Hitoshi; Shintani, Norihito; Tanaka, Kazuhiro; Mori, Wakaba; Hirose, Megumi; Matsuda, Toshio et al. (2001): Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23), S. 13355–13360. DOI: 10.1073/pnas.231094498.

Heinrich, Peter C.; Castell, Jose Vicente; Andus, Tilo (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. In: *The Biochemical journal* 265 (3), S. 621–636.

Hommos, Musab S.; Glasscock, Richard J.; Rule, Andrew D. (2017): Structural and Functional Changes in Human Kidneys with Healthy Aging. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. DOI: 10.1681/ASN.2017040421.

Horvath, Gabriella; Racz, Boglarka; Szakaly, Peter; Kiss, Peter; Laszlo, Eszter; Hau, Lidia et al. (2010): Mice deficient in neuropeptide PACAP demonstrate increased sensitivity to in vitro kidney hypoxia. In: *Transplantation proceedings* 42 (6), S. 2293–2295. DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.05.015.

Huang, Minta; Shirahase, H.; Rorstad, O. P. (1993): Comparative study of vascular relaxation and receptor binding by PACAP and VIP. In: *Peptides* 14 (4), S. 755–762.



Huang, Yadong; Mahley, Robert W. (2014): Apolipoprotein E. Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. In: *Neurobiology of disease* 72 Pt A, S. 3–12. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.08.025.

Iemolo, Attilio; Ferragud, Antonio; Cottone, Pietro; Sabino, Valentina (2015): Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide in the Central Amygdala Causes Anorexia and Body Weight Loss via the Melanocortin and the TrkB Systems. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 40 (8), S. 1846–1855. DOI: 10.1038/npp.2015.34.

Ishimura, Atsunori; Watanabe, Maho; Nakashima, Hitoshi; Ito, Kenji; Miyake, Katsuhisa; Mochizuki, Shizue et al. (2009): Lipoprotein glomerulopathy induced by ApoE-Sendai is different from glomerular lesions in aged apoE-deficient mice. In: *Clinical and experimental nephrology* 13 (5), S. 430–437. DOI: 10.1007/s10157-009-0195-1.

Ivic, Ivan; Fulop, Balazs D.; Juhasz, Tamas; Reglodi, Dora; Toth, Gabor; Hashimoto, Hitoshi et al. (2017): Backup Mechanisms Maintain PACAP/VIP-Induced Arterial Relaxations in Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Deficient Mice. In: *Journal of vascular research* 54 (3), S. 180–192. DOI: 10.1159/000457798.

Jones, Simon A. (2005): Directing transition from innate to acquired immunity. Defining a role for IL-6. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (6), S. 3463–3468.

Karasawa, Tadayoshi; Takahashi, Masafumi (2017): Role of NLRP3 Inflammasomes in Atherosclerosis. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 24 (5), S. 443–451. DOI: 10.5551/jat.RV17001.

Kästner, Andrea; Bruch, Leonhard; Will-Shahab, Liane; Modersohn, Diethelm.; Baumann, Gert (1995): Pituitary adenylate cyclase activating peptides are endothelium-independent dilators of human and porcine coronary arteries. In: *Agents and actions. Supplements* 45, S. 283–289.

Kataoka, Hiroshi; Ohara, Mamiko; Honda, Kazuho; Mochizuki, Takahiro; Nitta, Kosaku (2011): Maximal glomerular diameter as a 10-year prognostic indicator for IgA nephropathy. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the*

*European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26 (12), S. 3937–3943. DOI: 10.1093/ndt/gfr139.

Keller, Gunhild; Zimmer, Gisela; Mall, Gerhard; Ritz, Eberhard; Amann, Kerstin (2003): Nephron number in patients with primary hypertension. In: *The New England journal of medicine* 348 (2), S. 101–108. DOI: 10.1056/NEJMoa020549.

Khan, Altaf-M; Li, Min; Brant, Elizabeth; Maderdrut, Jerome L.; Majid, Dewan S. A.; Simon, Eric E.; Batuman, Vecihi (2011): Renoprotection with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in cyclosporine A-induced nephrotoxicity. In: *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 59 (5), S. 793–802. DOI: 10.2310/JIM.0b013e31821452a2.

Koolman, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4., vollständig überarbeitet und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Laburthe, Marc; Couvineau, Alain; Tan, Var (2007): Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP. Structure, models of activation and pharmacology. In: *Peptides* 28 (9), S. 1631–1639. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.04.026.

Langheinrich, Alexander C.; Kampschulte, Marian; Scheiter, Franziska; Dierkes, Christian; Stieger, Philip; Bohle, Rainer M.; Weidner, Wolfgang (2010): Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. In: *BMC nephrology* 11, S. 18–25. DOI: 10.1186/1471-2369-11-18.

Lee, Sik; Huen, Sarah; Nishio, Hitoshi; Nishio, Saori; Lee, Heung Kyu; Choi, Bum-Soon et al. (2011): Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (2), S. 317–326. DOI: 10.1681/ASN.2009060615.

Lee, Won-Young; Allison, Matthew A.; Kim, Dong-Jun; Song, Chan-Hee; Barrett-Connor, Elizabeth (2007): Association of interleukin-6 and C-reactive protein with subclinical carotid atherosclerosis (the Rancho Bernardo Study). In: *The American journal of cardiology* 99 (1), S. 99–102. DOI: 10.1016/j.amjcard.2006.07.070.

Li, Min; Balamuthusamy, Saravanan; Khan, Altaf M.; Maderdrut, Jerome L.; Simon, Eric E.; Batuman, Vecihi (2011): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents

cisplatin-induced renal failure. In: *Journal of molecular neuroscience* : MN 43 (1), S. 58–66. DOI: 10.1007/s12031-010-9394-1.

Li, Min; Khan, Altaf-M; Maderdrut, Jerome L.; Simon, Eric E.; Batuman, Vecihi (2010): The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury. In: *American journal of nephrology* 32 (6), S. 522–532. DOI: 10.1159/000321491.

Lillie, R. D.; Ashburn, L. L. (1943): Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. In: *Archs.Path.* (36), S. 432–440.

Lim, Yen Ying; Williamson, Robert; Laws, Simon M.; Villemagne, Victor L.; Bourgeat, Pierrick; Fowler, Christopher et al. (2017): Effect of APOE Genotype on Amyloid Deposition, Brain Volume, and Memory in Cognitively Normal Older Individuals. In: *Journal of Alzheimer's disease* : JAD. DOI: 10.3233/JAD-170072.

Lüllmann-Rauch, Renate (2009): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Mahley, Robert W. (2017): Apolipoprotein E. Remarkable Protein Sheds Light on Cardiovascular and Neurological Diseases. In: *Clinical chemistry* 63 (1), S. 14–20. DOI: 10.1373/clinchem.2016.255695.

Mahley, Robert W.; Innerarity, Thomas L.; Rall, Stanley C.; Weisgraber, Karl H. (1984): Plasma lipoproteins. Apolipoprotein structure and function. In: *Journal of lipid research* 25 (12), S. 1277–1294.

Mahmud, Azra; Feely, John (2005): Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 46 (5), S. 1118–1122. DOI: 10.1161/01.HYP.0000185463.27209.b0.

Maimaitiyiming, Hasiyeti; Clemons, Kate; Zhou, Qi; Norman, Heather; Wang, Shuxia (2015): Thrombospondin1 deficiency attenuates obesity-associated microvascular complications in ApoE<sup>-/-</sup> mice. In: *PloS one* 10 (3), e0121403. DOI: 10.1371/journal.pone.0121403.

Martinez, Carmen; Delgado, Mario; Pozo, David; Leceta, Javier; Calvo, Juan R.; Ganea, Doina; Gomariz, Rosa P. (1998): VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels

in resting peritoneal macrophages. In vitro and in vivo studies. In: *Journal of neuroimmunology* 85 (2), S. 155–167.

May, Victor; Vizzard, Margaret A. (2010): Bladder dysfunction and altered somatic sensitivity in PACAP-/- mice. In: *The Journal of urology* 183 (2), S. 772–779. DOI: 10.1016/j.juro.2009.09.077.

Merkel, Martin; Loeffler, Britta; Kluger, Malte; Fabig, Nathalie; Geppert, Gesa; Pennacchio, Len A. et al. (2005): Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (22), S. 21553–21560. DOI: 10.1074/jbc.M411412200.

Moody, Terry W.; Nuche-Berenguer, Bernardo; Jensen, Robert T. (2016): Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, and their receptors and cancer. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 23 (1), S. 38–47. DOI: 10.1097/MED.0000000000000218.

Mori, Hiroyoshi; Nakamachi, Tomoya; Ohtaki, Hirokazu; Yofu, Sachiko; Sato, Atsushi; Endo, Kimi et al. (2010): Cardioprotective effect of endogenous pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on Doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. In: *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74 (6), S. 1183–1190.

Moro, Osamu; Lerner, Ethan A. (1997): Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (2), S. 966–970.

Müller, Justus G.; Kuhlencordt, Peter (2017): Arteriosklerose: Ätiologie und Pathogenese. In: Eike Sebastian Debus und Walter Gross-Fengels (Hg.): Operative und interventionelle Gefäßmedizin. Living reference work, continuously updated edition. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Reference Medizin), S. 1–14.

Mustafa, Tomris; Jiang, Sunny Zhihong; Eiden, Adrian M.; Weihe, Eberhard; Thistlethwaite, Ian; Eiden, Lee E. (2015): Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint

stress in male C57BL/6 mice. In: *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 18 (4), S. 408–418.

DOI: 10.3109/10253890.2015.1025044.

Nakashima, Yutaka; Plump, Andrew S.; Raines, Elaine W.; Breslow, Jan L.; Ross, Russell (1994): ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. In: *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 14 (1), S. 133–140.

Navab, Mohamad; Ananthramaiah, G. M.; Reddy, Srinivasa T.; van Lenten, Brian J.; Ansell, Benjamin J.; Fonarow, Gregg C. et al. (2004): The oxidation hypothesis of atherogenesis. The role of oxidized phospholipids and HDL. In: *Journal of lipid research* 45 (6), S. 993–1007. DOI: 10.1194/jlr.R400001-JLR200.

Niewiadomski, Pawel; Coute-Monvoisin, Anne-Claire; Abad, Catalina; Ngo, Danny; Menezes, Adrian; Waschek, James A. (2008): Mice deficient in both pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide survive, but display growth retardation and sex-dependent early death. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 36 (1-3), S. 200–207. DOI: 10.1007/s12031-008-9085-3.

Ojala, Jacqueline; Tooke, Katharine; Hsiang, Harrison; Girard, Beatrice M.; May, Victor; Vizzard, Margaret A. (2018): PACAP/PAC1 Expression and Function in Micturition Pathways. In: *Journal of molecular neuroscience : MN*. DOI: 10.1007/s12031-018-1170-7.

Okabayashi, Yusuke; Kanzaki, Go; Tsuboi, Nobuo; Haruhara, Kotaro; Koike, Kentaro; Ikegami, Masahiro et al. (2018): Heterogeneous distribution of glomerular size in adult kidneys with normal renal function. In: *Pathology international*. DOI: 10.1111/pin.12681.

Otto, Christiane; Kovalchuk, Yury; Wolfer, David Paul; Gass, Peter; Martin, Miguel; Zuschratter, Werner et al. (2001a): Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (15), S. 5520–5527.

Otto, Christiane; Martin, Miguel; Wolfer, David Paul; Lipp, Hans-Peter; Maldonado, Rafael; Schutz, Günther (2001b): Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. In: *Brain research. Molecular brain research* 92 (1-2), S. 78–84.

Park, Young Mi; Febbraio, Maria; Silverstein, Roy L. (2009): CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (1), S. 136–145. DOI: 10.1172/JCI35535.

Pennacchio, Len A.; Olivier, Michael; Hubacek, Jaroslav A.; Cohen, Jonathan C.; Cox, David R.; Fruchart, Jean-Charles et al. (2001): An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5540), S. 169–173. DOI: 10.1126/science.1064852.

Perdomo, German; Dong, Henry H. (2009): Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. In: *Aging* 1 (1), S. 17–27. DOI: 10.18632/aging.100004.

Plump, Andrew S.; Smith, Jonathan D.; Hayek, Tony; Aalto-Setälä, Katriina; Walsh, Annemarie; Verstuyft, Judy G. et al. (1992): Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. In: *Cell* 71 (2), S. 343–353.

Pschyrembel, Willibald; Dornblüth, Otto (Hg.) (2004): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. [... enthält ... 330 Tabellen]. 260., neu bearb. Aufl. Berlin: de Gruyter.

Rassart, Eric; Bedirian, Arda; Do Carmo, Sonia; Guinard, Olivier; Sirois, Jacinthe; Terrisse, Laurence; Milne, Ross (2000): Apolipoprotein D. In: *Biochimica et biophysica acta* 1482 (1-2), S. 185–198.

Rassow, Joachim (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://www.thieme.de/ebooklibrary/inhalte/3131253517/index.html>.

Reglodi, Dora; Jungling, Adel; Longuespée, Rémi; Kriegsmann, Joerg; Casadonte, Rita; Kriegsmann, Mark et al. (2018): Accelerated pre-senile systemic amyloidosis in PACAP knockout mice - a protective role of PACAP in age-related degenerative processes. In: *The Journal of pathology* 245 (4), S. 478–490. DOI: 10.1002/path.5100.

Reglodi, Dora; Kiss, Peter; Horvath, Gabriella; Lubics, Andrea; Laszlo, Eszter; Tamas, Andrea et al. (2012a): Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in the urinary system, with special emphasis on its protective effects in the kidney. In: *Neuropeptides* 46 (2), S. 61–70. DOI: 10.1016/j.npep.2011.05.001.

Reglodi, Dora; Kiss, Peter; Szabadfi, Krisztina.; Atlasz, Tamas; Gabriel, Robert; Horvath, Gabriella et al. (2012b): PACAP is an endogenous protective factor-insights from PACAP-deficient mice. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 48 (3), S. 482–492. DOI: 10.1007/s12031-012-9762-0.

Rensing, Ludger; Rippe, Volkhard (2014): Das Ausscheidungssystem. Niere und Blase. In: Ludger Rensing und Volkhard Rippe (Hg.): Altern. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 175–186.

Ridker, Paul M. (2016): From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1. Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. In: *Circulation research* 118 (1), S. 145–156. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306656.

Romeis, Benno (1968): Mikroskopische Technik. 16., neubearb. u. verb. Aufl. München, Wien: Oldenbourg.

Rosenfeld, Michael E.; Butler, Susan; Ord, Virginia A.; Lipton, Beth A.; Dyer, Cheryl A.; Curtiss, Linda K.; Palinski, Wulfittum, Joseph L. (1993): Abundant expression of apoprotein E by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. In: *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 13 (9), S. 1382–1389.

Ross-Ascuitto, Nancy T.; Ascuitto, Robert J.; Ramage, David; Kydon, Donald W.; Coy, David H.; Kadowitz, Philip J. (1993): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. A neuropeptide with potent inotropic and coronary vasodilatory effects in neonatal pig hearts. In: *Pediatric research* 34 (3), S. 323–328. DOI: 10.1203/00006450-199309000-00017.

Sakamoto, Kenichi; Kuno, Kyoko; Takemoto, Minoru; He, Peng; Ishikawa, Takahiro; Onishi, Shunichiro et al. (2015): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects glomerular podocytes from inflammatory injuries. In: *Journal of diabetes research* 2015, S. 727152. DOI: 10.1155/2015/727152.

Sano, Hirofumi; Miyata, Atsuro; Horio, Takeshi; Nishikimi, Toshio; Matsuo, Hisayuki; Kangawa, Kenji (2002): The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on cultured rat cardiocytes as a cardioprotective factor. In: *Regulatory peptides* 109 (1-3), S. 107–113.

Schiele, Francois (2009): Renal dysfunction and coronary disease. A high-risk combination. In: *Journal of nephrology* 22 (1), S. 39–45.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo; Voll, Markus; Wesker, Karl (2009): Innere Organe. 118 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker).

Sherwood, Nancy M.; Krueckl, Sandra L.; McRory, John E. (2000): The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. In: *Endocrine Reviews* 21 (6), S. 619–670. DOI: 10.1210/er.21.6.619.

Statistisches Bundesamt (Hg.) (2017): Pressemitteilung vom 19. Januar 2017 – 022/17. Online verfügbar unter [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/01/PD17\\_022\\_232pdf.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/01/PD17_022_232pdf.pdf?__blob=publicationFile).

Stemmer, Kerstin; Perez-Tilve, Diego; Ananthakrishnan, Gayathri; Bort, Anja; Seeley, Randy J.; Tschöp, Matthias H. et al. (2012): High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. In: *Disease models & mechanisms* 5 (5), S. 627–635. DOI: 10.1242/dmm.009407.

Szakaly, Peter; Laszlo, Eszter; Kovacs, Krisztina; Racz, Boglarka; Horvath, Gabriella; Ferencz, Andrea et al. (2011): Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) show increased susceptibility to in vivo renal ischemia/reperfusion injury. In: *Neuropeptides* 45 (2), S. 113–121. DOI: 10.1016/j.npep.2010.12.003.

Tai, E. Shyong; Ordovas, Jose M. (2008): Clinical significance of apolipoprotein A5. In: *Current opinion in lipidology* 19 (4), S. 349–354. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328304b681.



Tomimoto, Shuhej; Ojika, Tatsuya; Shintani, Norihito; Hashimoto, Hitoshi; Hamagami, Ken-ichi; Ikeda, Kazuya et al. (2008): Markedly Reduced White Adipose Tissue and Increased Insulin Sensitivity in Adcyap1-Deficient Mice. In: *J Pharmacol Sci* 107 (1), S. 41–48. DOI: 10.1254/jphs.FP0072173.

Uneda, Kazushi; Wakui, Hiromichi; Maeda, Akinobu; Azushima, Kengo; Kobayashi, Ryu; Haku, Sona et al. (2017): Angiotensin II Type 1 Receptor-Associated Protein Regulates Kidney Aging and Lifespan Independent of Angiotensin. In: *Journal of the American Heart Association* 6 (8). DOI: 10.1161/JAHA.117.006120.

Vamos, Zoltan; Ivic, Ivan; Cseplo, Peter; Toth, Gabor; Tamas, Andrea; Reglodi, Dora; Koller, Akos (2014): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induces relaxations of peripheral and cerebral arteries, which are differentially impaired by aging. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 54 (3), S. 535–542. DOI: 10.1007/s12031-014-0349-9.

van Capelleveen, Julian C.; Bernelot Moens, Sophie J.; Yang, Xiaohong; Kastelein, John J. P.; Wareham, Nicholas J.; Zwinderman, Aeilko H. et al. (2017): Apolipoprotein CIII Levels and Incident Coronary Artery Disease Risk. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309007.

van der Vliet, Hendrik N.; Sammels, Martijn Groenink; Leegwater, Aad C. J.; Levels, Johannes H. M.; Reitsma, Pieter H.; Boers, Willem; Chamuleau, Robert A. F. M. (2001): Apolipoprotein A-V. A novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (48), S. 44512–44520. DOI: 10.1074/jbc.M106888200.

Vaudry, David; Falluel-Morel, Anthony; Bourgault, Steve; Basille, Magali; Burel, Delphine; Wurtz, Olivier et al. (2009): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors. 20 years after the discovery. In: *Pharmacological reviews* 61 (3), S. 283–357. DOI: 10.1124/pr.109.001370.

Vaudry, David; Gonzalez, Bruno J.; Basille, Magali; Yon, Laurent; Fournier, Alain; Vaudry, Hubert (2000): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors. From structure to functions. In: *Pharmacological reviews* 52 (2), S. 269–324.

Vlassara, Helen; Torreggiani, Massimo; Post, James B.; Zheng, Feng; Uribarri, Jaime; Striker, Gary E. (2009): Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. In: *Kidney international. Supplement* (114), 3-11. DOI: 10.1038/ki.2009.401.

Vu, John P.; Goyal, Deepinder; Luong, Leon; Oh, Suwan; Sandhu, Ravneet; Norris, Joshua et al. (2015): PACAP intraperitoneal treatment suppresses appetite and food intake via PAC1 receptor in mice by inhibiting ghrelin and increasing GLP-1 and leptin. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 309 (10), G816-25. DOI: 10.1152/ajpgi.00190.2015.

Wächtershäuser, Astrid; Stein, Jürgen (2007): Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel. Physiologie und Pathophysiologie. In: *Pharm. Unserer Zeit* 36 (2), S. 98–107. DOI: 10.1002/pauz.200600207.

Wang, Xiaoxin X.; Jiang, Tao; Shen, Yan; Adorini, Luciano; Pruzanski, Mark; Gonzalez, Frank J. et al. (2009): The farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism and diet-induced renal inflammation, fibrosis, and proteinuria. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 297 (6), F1587-96. DOI: 10.1152/ajprenal.00404.2009.

Wang, Yuehai; Lu, Huixia; Huang, Ziyang; Lin, Huili; Lei, Zhenmin; Chen, Xiaoqing et al. (2014): Apolipoprotein E-knockout mice on high-fat diet show autoimmune injury on kidney and aorta. In: *Biochemical and biophysical research communications* 450 (1), S. 788–793. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.060.

Warren, John B.; Donnelly, Louise E.; Cullen, Seamus; Robertson, Blair E.; Ghatei, Mohammad A.; Bloom, Stephen R.; MacDermot, John (1991): Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. A novel, long-lasting, endothelium-independent vasorelaxant. In: *European journal of pharmacology* 197 (2-3), S. 131–134.

Welsch, Ulrich; Deller, Thomas (2011): Sobotta Lehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=1722830>.

Wray, Victor; Kakoschke, Christel; Nokihara, Kiyoshi; Naruse, Satoru (1993): Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Biochemistry* 32 (22), S. 5832–5841.

Xie, Luke; Koukos, Georgios; Barck, Kai; Foreman, Oded; Lee, Wyne P.; Brendza, Robert et al. (2018): Micro-CT imaging and structural analysis of glomeruli in a model of Adriamycin-induced nephropathy. In: *American journal of physiology. Renal physiology*. DOI: 10.1152/ajprenal.00331.2018.

Yu, Rong-Jie; Zhang, Ling; Yi, Tian-Hong; Xie, Shan-Shan; Dai, Yun (2008): In vivo anti-obesity effect of the agonist for receptor VPAC1. In: *Acta Physiologica Sinica* 60 (6), S. 751–758.

Yudkin, John S.; Kumari, Meena; Humphries, Steve E.; Mohamed-Ali, Vidya (2000): Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease. Is interleukin-6 the link? In: *Atherosclerosis* 148 (2), S. 209–214.

Zhang, Sunny H.; Reddick, Robert L.; Piedrahita, Jorge A.; Maeda, Nobuyo (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5081), S. 468–471.

Zhou, Tian-Biao (2015): Signaling pathway factors expression in renal tissue of apoE-knockout mice. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 35 (5), S. 435–438. DOI: 10.3109/10799893.2014.1000465.

## 7 Anhang

### Normalfutter Mäuse: Tiernummern nach Genotypen

ApoE <sup>-/-</sup>	PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>
T599	FzH44	T145
FzH45	FzH95	T600
FzH46	FzH96	T427
FzH47	FzH51	T433
FzH41	FzH52	T595
FzH55	FzH54	T560
FzH323	FzH448	T601
FzH324		T603
FzH325		

Tiernummern nach Genotypen geordnet, 20 Wochen NF Tiere

### Cholesterinfutter Mäuse: Tiernummern nach Genotypen

ApoE <sup>-/-</sup>	PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	WT
FzH493	FzH89	T471	T458
FzH540	FzH490	T472	T461
FzH542	FzH551	T474	T462
FzH543	FzH553	T475	T545
FzH544	FzH555	T484	FzH855
FzH545	FzH558	T485	FzH856
FzH980	FzH741	T489	
M430	FzH742	T490	
		T491	

Tiernummern nach Genotypen geordnet, 20 Wochen CED Tiere

In den nachfolgenden Tabellen stehen die P-Werte in einer Zeile in allen Zellen derjenigen Gruppen, die miteinander verglichen wurden (Zwei- und Viergruppenvergleiche).

## Anhang

### Gewicht

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	33,87	28,99	32,96	33,24	38,25	34,88	37,13
SEM	1,4	0,94	2,45	1,14	2,33	1,13	1,40
P-Werte T-Test				<b>0,0252</b>			<b>0,0252</b>
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>0,011</b>	<b>0,011</b>		<b>0,011</b>	<b>0,011</b>		
Faktor Knockout	0,967	0,967		0,967	0,967		
Faktor Futter	0,689		0,689	0,689		0,689	
Faktor Knockout	0,818		0,818	0,818		0,818	
P-Werte Holm-Sidak	<b>0,038</b>	<b>0,038</b>					
				<b>0,033</b>	<b>0,033</b>		
	0,774			0,774			
		<b>&lt;0,001</b>			<b>&lt;0,001</b>		

Tiergewicht in g, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt

### Plasma-Cholesterin

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	503,75	439,58	563,01	985,94	787,26	791,35	105,20
SEM	50,37	39,17	50,7	121,24	127,06	53,99	18,86
P-Werte T-Test				<b>0,001</b>			<b>0,001</b>
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		
Faktor Knockout	0,167	0,167		0,167	0,167		
Faktor Futter	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	
Faktor Knockout	0,346		0,346	0,346		0,346	
P-Werte Holm-Sidak	0,623	0,623		0,145	0,145		
	<b>&lt;0,001</b>			<b>&lt;0,001</b>			
		<b>0,014</b>			<b>0,014</b>		
	0,545		0,545	0,069		0,069	
			<b>0,029</b>			<b>0,029</b>	

Plasma-Cholesterin in mg/dl, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

## Anhang

### Plasma-Triglyceride

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	83,69	105,14	107,61	94,92	146,56	68,00	78,70
SEM	13,65	20,25	17,88	14,99	12,73	10,09	23,11
P-Werte T-Test				0,279			0,279
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,104	0,104		0,104	0,104		
Faktor Knockout	0,027	0,027		0,027	0,027		
Faktor Futter	0,301		0,301	0,301		0,301	
Faktor Knockout	0,974		0,974	0,974		0,974	
P-Werte Holm-Sidak	0,323	0,323		<b>0,032</b>	<b>0,032</b>		
	0,618			0,618			
		<b>0,07</b>			<b>0,07</b>		

Plasma-Triglyceride in mg/dl, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### Anzahl Nierenkörperchen

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	10,96	11,69	10,89	10,19	12,71	12,06	11,66
SEM	0,28	0,34	0,27	0,25	0,27	0,3	0,34
P-Werte T-Test				0,132			0,132
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,872	0,872		0,872	0,872		
Faktor Knockout	<b>0,036</b>	<b>0,036</b>		<b>0,036</b>	<b>0,036</b>		
Faktor Futter	0,782		0,782	0,782		0,782	
Faktor Knockout	0,217		0,217	0,217		0,217	
P-Werte Holm-Sidak	0,491	0,491		<b>0,022</b>	<b>0,022</b>		
	0,448			0,448			
		0,352			0,352		

Anzahl der Nierenkörperchen pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

## Anhang

### Fläche Nierenkörperchen

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	6556,24	5816,36	5628,70	7043,33	6576,28	5534,19	5795,37
SEM	219	209,6	224,32	214	181,3	257,76	253,6
P-Werte T-Test				<b>0,0413</b>			<b>0,0413</b>
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,054	0,054		0,054	0,054		
Faktor Knockout	0,061	0,061		0,061	0,061		
Faktor Futter	0,598		0,598	0,598		0,598	
Faktor Knockout	<b>0,002</b>		<b>0,002</b>	<b>0,002</b>		<b>0,002</b>	
P-Werte Holm-Sidak	0,085		0,085	<b>0,007</b>		<b>0,007</b>	
	0,358			0,358			
			0,857			0,857	

Fläche der Nierenkörperchen in  $\mu\text{m}^2$ , Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak.

NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### Durchmesser Nierenkörperchen

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	91,50	87,44	82,39	92,51	93,38	83,94	85,35
SEM	1,64	1,99	2,0	2,02	2,0	1,95	1,93
P-Werte T-Test				0,0806			0,0806
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,158	0,158		0,158	0,158		
Faktor Knockout	0,511	0,511		0,511	0,511		
Faktor Futter	0,648		0,648	0,648		0,648	
Faktor Knockout	<b>0,003</b>		<b>0,003</b>	<b>0,003</b>		<b>0,003</b>	
P-Werte Holm-Sidak	<b>0,027</b>		<b>0,027</b>	<b>0,036</b>		<b>0,036</b>	
	0,799			0,799			
			0,695			0,695	

Durchmesser der Nierenkörperchen in  $\mu\text{m}$ , Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-

Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### Bindegewebsanteil

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	14,33	16,99	14,67	15,83	15,17	14,72	13,72
SEM	1,83	1,52	0,76	0,75	1,0	0,72	0,93
P-Werte T-Test				0,101			0,101
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,907	0,907		0,907	0,907		
Faktor Knockout	0,478	0,478		0,478	0,478		
Faktor Futter	0,507		0,507	0,507		0,507	
Faktor Knockout	0,741		0,741	0,741		0,741	

Bindegewebsanteil im Nierenkortex in %, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout.

### MOMA-2

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	3,98	3,69	3,04	3,52	2,72	3,21	1,75
SEM	0,36	0,33	0,36	0,33	0,30	0,35	0,32
P-Werte T-Test				<b>0,0201</b>			<b>0,0201</b>
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,186	0,186		0,186	0,186		
Faktor Knockout	0,36	0,36		0,36	0,36		
Faktor Futter	0,8		0,8	0,8		0,8	
Faktor Knockout	0,316		0,316	0,316		0,316	

MOMA-2-positive Zellen pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.



F4/80

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	0,79	0,90	0,74	2,03	1,65	0,50	0,52
SEM	0,15	0,22	0,18	0,27	0,19	0,12	0,13
P-Werte T-Test/MW				0,142 (MW)			0,142 (MW)
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>0,013</b>	<b>0,013</b>		<b>0,013</b>	<b>0,013</b>		
Faktor Knockout	0,71	0,71		0,71	0,71		
Faktor Futter	0,152		0,152	0,152		0,152	
Faktor Knockout	<b>0,02</b>		<b>0,02</b>	<b>0,02</b>		<b>0,02</b>	
P-Werte Holm-Sidak	0,859	0,859		0,474	0,474		
	<b>0,013</b>			<b>0,013</b>			
		0,167			0,167		
	0,894		0,894	<b>0,002</b>		<b>0,002</b>	

F4/80-positive Zellen pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, MW=Mann-Whitney Rank Sum Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

Interleukin-6: Glomerulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	102,49	75,57	115,46	141,43	150,80	124,74	105,80
SEM	14,34	17,22	17,56	16,57	11,43	14,40	18,71
P-Werte T-Test				0,181			0,181
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		
Faktor Knockout	0,562	0,562		0,562	0,562		
Faktor Futter	0,141		0,141	0,141		0,141	
Faktor Knockout	0,907		0,907	0,907		0,907	
P-Werte Holm-Sidak	0,222	0,222		0,656	0,656		
	0,072			0,072			
		<b>0,002</b>			<b>0,002</b>		

IL-6-positive Zellen in den Glomeruli pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### Interleukin-6: Tubulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	714,88	628,29	838,63	934,20	921,34	887,05	891,95
SEM	73,85	27,98	40,88	40,62	70,40	47,39	76,96
P-Werte T-Test				0,612			0,612
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		
Faktor Knockout	0,229	0,229		0,229	0,229		
Faktor Futter	<b>0,018</b>		<b>0,018</b>	<b>0,018</b>		<b>0,018</b>	
Faktor Knockout	0,476		0,476	0,476		0,476	
P-Werte Holm-Sidak	0,122	0,122		0,885	0,885		
	<b>0,019</b>			<b>0,019</b>			
		<b>&lt;0,001</b>			<b>&lt;0,001</b>		
	0,121		0,121	0,522		0,522	
			0,526			0,526	

IL-6-positive Zellen im Tubulussystem pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### Interleukin-6: Vaskulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	11,57	9,24	17,42	9,55	12,67	10,78	13,47
SEM	3,82	1,72	3,66	3,20	3,24	3,87	5,05
P-Werte T-Test				0,505			0,505
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,971	0,971		0,971	0,971		
Faktor Knockout	0,893	0,893		0,893	0,893		
Faktor Futter	0,17		0,17	0,17		0,17	
Faktor Knockout	0,466		0,466	0,466		0,466	

Vaskulär gelegene IL-6-positive Zellen pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout.

Interleukin-6: Interstitiell

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	25,72	22,88	20,78	33,61	39,12	22,86	21,80
SEM	5,62	7,44	3,89	6,56	5,05	4,14	4,53
P-Werte T-Test				0,193			0,193
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,061	0,061		0,061	0,061		
Faktor Knockout	0,83	0,83		0,83	0,83		
Faktor Futter	0,358		0,358	0,358		0,358	
Faktor Knockout	0,153		0,153	0,153		0,153	

IL-6-positive Zellen im Interstitium pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout.

TNFα: Glomerulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	123,27	80,61	86,07	117,92	73,66	90,62	82,78
SEM	21,88	12,37	16,37	22,81	13,39	12,02	14,90
P-Werte T-Test/MW				0,282 (MW)			0,282 (MW)
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,748	0,748		0,748	0,748		
Faktor Knockout	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>		<b>0,03</b>	<b>0,03</b>		
Faktor Futter	0,983		0,983	0,983		0,983	
Faktor Knockout	0,1		0,1	0,1		0,1	
P-Werte Holm-Sidak	0,125	0,125		0,109	0,109		
	0,838			0,838			
		0,803			0,803		

TNFα-positive Zellen in den Glomeruli pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, MW=Mann-Whitney Rank Sum Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

## Anhang

### TNF $\alpha$ : Tubulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	644,60	527,32	567,00	507,51	545,16	500,75	548,84
SEM	34,87	31,13	46,14	23,53	18,87	35,57	49,95
P-Werte T-Test				0,431			0,431
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	<b>0,045</b>	<b>0,045</b>		<b>0,045</b>	<b>0,045</b>		
Faktor Knockout	0,172	0,172		0,172	0,172		
Faktor Futter	<b>0,008</b>		<b>0,008</b>	<b>0,008</b>		<b>0,008</b>	
Faktor Knockout	0,245		0,245	0,245		0,245	
P-Werte Holm-Sidak	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>		0,355	0,355		
	<b>0,001</b>			<b>0,001</b>			
		0,67			0,67		
	0,14		0,14	0,892		0,892	
			0,206			0,206	

TNF $\alpha$ -positive Zellen im Tubulussystem pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout. Signifikante Unterschiede fett gedruckt.

### TNF $\alpha$ : Vaskulär

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	31,51	26,24	20,57	15,06	15,25	24,33	19,35
SEM	9,42	8,35	4,56	5,65	5,73	4,64	7,37
P-Werte T-Test/MW				0,755 (MW)			0,755 (MW)
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,198	0,198		0,198	0,198		
Faktor Knockout	0,343	0,343		0,343	0,343		
Faktor Futter	0,351		0,351	0,351		0,351	
Faktor Knockout	0,901		0,901	0,901		0,901	

Vaskulär gelegene TNF $\alpha$ -positive Zellen pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, MW=Mann-Whitney Rank Sum Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout.

## Anhang

### TNF $\alpha$ : Interstitiell

	NF ApoE <sup>-/-</sup>	NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED ApoE <sup>-/-</sup>	CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup>	CED WT
Mittelwert	20,74	11,97	19,52	15,43	12,12	20,08	20,82
SEM	7,74	3,97	7,51	5,11	4,33	3,64	5,36
P-Werte T-Test				0,487			0,487
P-Werte ANOVA: Vergleiche der DKO mit ApoE <sup>-/-</sup> (Kontrolle)							
Faktor Futter	0,374	0,374		0,374	0,374		
Faktor Knockout	0,661	0,661		0,661	0,661		
Faktor Futter	0,705		0,705	0,705		0,705	
Faktor Knockout	0,783		0,783	0,783		0,783	

TNF $\alpha$ -positive Zellen im Interstitium pro mm<sup>2</sup>, Mittelwert, SEM=Standardfehler, T-Test, ANOVA und Holm-Sidak. NF=Normalfutter, CED=Cholesterin Enriched Diet, DKO=Doppel-Knockout.

### Korrelationen IL-6 vs. TNF $\alpha$

NF gesamt (n=21)								
		Glom TNF	Glom IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r=	0,167	0,277	0,161	0,321	-0,144	0,121	0,308
	p=	0,468	0,224	0,485	0,155	0,534	0,601	0,174
Glom TNF	r=		0,0748	0,395	0,21	0,568	0,254	0,258
	p=		0,747	0,0762	0,361	0,00725	0,266	0,259
Tub IL6	r=			0,165	0,395	0,0967	0,251	0,414
	p=			0,475	0,0767	0,677	0,273	0,0621
Tub TNF	r=				0,3	0,142	0,245	0,569
	p=				0,187	0,539	0,285	0,00707
Vasc IL6	r=					0,358	0,0887	0,287
	p=					0,111	0,702	0,208
Vasc TNF	r=						0,363	0,243
	p=						0,106	0,289
Inter IL6	r=							0,418
	p=							0,0592

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen aller Genotypen nach NF zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

## Anhang

NF ApoE <sup>-/-</sup> (n=7)								
		Glom TNF	Glom IL6	TubTNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r=	0,281	0,29	-0,375	0,303	0,105	-0,105	-0,386
	p=	0,541	0,528	0,407	0,509	0,823	0,823	0,393
Glom TNF	r=		0,155	0,249	0,43	0,873	0,541	0,143
	p=		0,74	0,59	0,336	0,0102	0,209	0,76
Tub IL6	r=			0,504	0,703	0,344	0,631	0,572
	p=			0,249	0,0781	0,45	0,129	0,18
Tub TNF	r=				0,333	0,36	0,508	0,601
	p=				0,466	0,427	0,245	0,153
Vasc IL6	r=					0,692	0,428	0,616
	p=					0,0849	0,338	0,141
Vasc TNF	r=						0,572	0,573
	p=						0,18	0,179
Inter IL6	r=							0,465
	p=							0,293

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach NF zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

NF PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> (n=7)								
		Glom TNF	Glom IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r=	-0,0689	-0,421	0,302	0,588	-0,257	0,476	0,924
	p=	0,883	0,347	0,51	0,165	0,579	0,28	0,0029
Glom TNF	r=		0,4	0,174	0,431	-0,01	-0,0645	-0,199
	p=		0,374	0,709	0,334	0,983	0,891	0,669
Tub IL6	r=			-0,631	-0,586	0,425	0,473	-0,226
	p=			0,129	0,167	0,342	0,283	0,626
Tub TNF	r=				0,688	-0,783	-0,466	0,105
	p=				0,0873	0,0373	0,292	0,823
Vasc IL6	r=					-0,311	-0,298	0,292
	p=					0,498	0,516	0,526
Vasc TNF	r=						0,0758	-0,135
	p=						0,872	0,774
Inter IL6	r=							0,65
	p=							0,114

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach NF zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

## Anhang

NF PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> (n=7)								
		Glom TNF	Glom IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r=	0,121	0,181	0,298	-0,0195	-0,567	-0,119	0,737
	p=	0,797	0,697	0,517	0,967	0,185	0,8	0,0589
Glom TNF	r=		-0,216	0,0828	-0,0939	0,0786	-0,155	0,368
	p=		0,643	0,86	0,841	0,867	0,739	0,417
Tub IL6	r=			-0,0249	-0,506	-0,643	-0,428	0,248
	p=			0,958	0,247	0,119	0,338	0,593
Tub TNF	r=				0,205	0,222	0,687	0,669
	p=				0,659	0,632	0,0883	0,1
Vasc IL6	r=					0,736	0,0474	-0,272
	p=					0,0592	0,92	0,555
Vasc TNF	r=						0,327	-0,463
	p=						0,473	0,296
Inter IL6	r=							0,281
	p=							0,542

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach NF zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

CED gesamt (n=31)								
		Glom TNF	Tub IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r =	0,0828	0,42	0,144	0,081	0,237	0,393	-0,0441
	p=	0,658	0,0186	0,439	0,665	0,199	0,0289	0,814
Glom TNF	r =		0,222	0,151	0,352	0,584	0,0904	0,295
	p=		0,231	0,416	0,0518	0,000567	0,629	0,107
Tub IL6	r =			0,249	0,175	0,275	0,415	0,154
	p=			0,176	0,346	0,134	0,0202	0,407
Tub TNF	r =				0,266	0,193	0,23	0,339
	p=				0,148	0,298	0,212	0,0618
Vasc IL6	r =					0,378	0,243	0,206
	p=					0,0361	0,188	0,266
Vasc TNF	r =						-0,124	0,29
	p=						0,507	0,114
Inter IL6	r =							-0,0176
	p=							0,925

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen aller Genotypen nach CED zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

## Anhang

CED ApoE <sup>-/-</sup> (n=8)								
		Glom TNF	Tub IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r =	-0,0428	0,792	0,444	0,0559	0,318	0,341	0,349
	p=	0,92	0,0191	0,271	0,895	0,443	0,408	0,397
Glom TNF	r =		0,327	-0,0542	0,771	0,701	0,132	0,481
	p=		0,429	0,899	0,025	0,0528	0,755	0,227
Tub IL6	r =			0,457	0,404	0,295	0,521	0,184
	p=			0,255	0,32	0,478	0,185	0,663
Tub TNF	r =				-0,122	-0,26	0,0656	0,323
	p=				0,773	0,534	0,877	0,435
Vasc IL6	r =					0,422	0,642	0,0848
	p=					0,298	0,0862	0,842
Vasc TNF	r =						0,019	0,609
	p=						0,964	0,109
Inter IL6	r =							-0,349
	p=							0,397

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

CED PACAP <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> (n=8)								
		Glom TNF	Tub IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r =	0,26	0,791	0,234	0,223	0,325	0,409	0,62
	p=	0,535	0,0195	0,577	0,596	0,432	0,315	0,101
Glom TNF	r =		0,00786	-0,107	0,656	0,815	-0,124	0,368
	p=		0,985	0,8	0,0773	0,0137	0,77	0,37
Tub IL6	r =			0,245	-0,105	0,0665	0,588	0,721
	p=			0,559	0,804	0,876	0,125	0,0437
Tub TNF	r =				0,128	-0,0924	0,716	0,315
	p=				0,764	0,828	0,0459	0,447
Vasc IL6	r =					<b>0,825</b>	-0,385	-0,127
	p=					<b>0,0117</b>	0,347	0,764
Vasc TNF	r =						-0,274	0,136
	p=						0,511	0,749
Inter IL6	r=							0,693
	p=							0,0568

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der PACAP<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz. Signifikante Ergebnisse fett gedruckt.



## Anhang

CED PAC1 <sup>-/-</sup> /ApoE <sup>-/-</sup> (n=9)								
		Glom TNF	Tub IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r =	0,162	-0,141	0,0682	0,259	0,231	-0,0739	-0,267
	p=	0,677	0,717	0,862	0,502	0,55	0,85	0,488
Glom TNF	r =		0,389	0,333	-0,267	0,927	0,144	0,0822
	p=		0,301	0,381	0,487	0,000325	0,711	0,833
Tub IL6	r =			0,185	0,203	0,494	0,181	0,279
	p=			0,633	0,601	0,176	0,641	0,468
Tub TNF	r =				-0,101	0,407	0,26	0,478
	p=				0,796	0,277	0,499	0,194
Vasc IL6	r =					-0,18	0,613	0,403
	p=					0,643	0,079	0,282
Vasc TNF	r =						0,0426	-0,0592
	p=						0,913	0,88
Inter IL6	r =							<b>0,712</b>
	p=							<b>0,0314</b>

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der PAC1<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse nach CED zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz. Signifikante Ergebnisse fett gedruckt.

CED WT (n=6)								
		Glom TNF	Tub IL6	Tub TNF	Vasc IL6	Vasc TNF	Inter IL6	Inter TNF
Glom IL6	r =	0,107	0,448	0,0695	-0,126	0,509	0,703	-0,462
	p=	0,84	0,373	0,896	0,813	0,302	0,12	0,356
Glom TNF	r =		0,291	0,852	0,721	0,233	0,416	0,174
	p=		0,575	0,0311	0,106	0,657	0,412	0,742
Tub IL6	r =			0,312	0,368	0,536	0,43	-0,573
	p=			0,548	0,473	0,273	0,395	0,235
Tub TNF	r =				0,93	0,612	0,13	0,476
	p=				0,00724	0,196	0,807	0,339
Vasc IL6	r =					0,614	0,0477	0,497
	p=					0,195	0,928	0,316
Vasc TNF	r =						0,171	0,207
	p=						0,746	0,693
Inter IL6	r =							-0,504
	p=							0,308

Korrelationen IL-6-positiver und TNF $\alpha$ -positiver Zellen der WT Mäuse nach CED zwischen Nierenkompartimenten, Glom=glomerulär, Tub=tubulär, Vasc=vaskulär, Inter=interstitiell; r=Korrelationskoeffizient nach Pearson, p=Signifikanz

## **8 *Verzeichnis akademischer Lehrer***

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren in alphabetischer Reihenfolge ohne akademische Titel:

Arweiler, Auschill, Braun, Cetin, Czubayko, Feuser, Fischer, Frankenberger, Gente, Gloerfeld, Himpel, Höffken, Jablonski-Momeni, Kinscherf, Korbmacher-Steiner, Lill, Lotzmann, Mengel, Milani, Mittag, Moll, Mutters, Neff, Neumüller, Nonnenmacher, Pieper, Roggendorf, Steiniger, Teymoortash, Weber, Weihe, Werner, Wrocklage

## 9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Verfassung dieser Dissertation unterstützt haben:

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf für die Möglichkeit der Dissertation unter seiner Leitung, die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Die Anfertigung der Dissertation war ein interessanter und fordernder Abschluss meiner akademischen Ausbildung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Lilli Mey für die außerordentlich gute und intensive Betreuung. Liebe Lilli, danke für deine Zeit und Geduld, deine Ratschläge und Ideen. Danke, dass du immer ansprechbar warst und auch in schwierigen Phasen Wege gefunden hast.

Auch Herrn Dr. Gabriel Bonaterra möchte ich ausdrücklich ein großes Dankeschön aussprechen. Ich danke allen Labormitarbeitern des Instituts, die mir bei Fragen immer gerne behilflich waren. Insbesondere danke ich Frau Susanne Wieber und Herrn Michael Dreher.

Ein ganz besonderer Dank geht an Philipp Mosen, der niemals müde wurde mich zu motivieren, sei es zum Neuanfangen oder zum Weitermachen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern. Danke für die bedingungslose Unterstützung, die ich von euch auf meinem Lebens- und Ausbildungsweg bekomme.